

**Synthese o-chinoider Fluoreszenzmarker für  
Stickstoffmonoxid und deren Anwendung in chemischen  
Systemen mit biologischer Relevanz**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie  
der Universität Essen

vorgelegt von

**Verena Christine Stenert**  
**geb. Gollnick**

aus Hamm in Westfalen

**Essen 2003**

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Boese

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2003

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1998 bis Mai 2002 im Institut für Organische Chemie an der Universität Essen unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann**

durchgeführt.

Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung und die Möglichkeit zur freien Gestaltung dieser interessanten Themenstellung und für seine wertvollen Ratschläge sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ferner danke ich

Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot für die freundliche Übernahme des Korreferates und vor allem für die Möglichkeit, am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen Experimente durchzuführen.

den jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Organische Chemie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und insbesondere Frau H. Kallweit für ihre hervorragende Zusammenarbeit sowie Herrn Dr. H.-G. Korth für die vielen Diskussionen und Anregungen und dafür, dass er sich die Zeit genommen hat, diese Arbeit zu korrigieren.

den Mitgliedern des Instituts für Physiologische Chemie, vor allem Frau Priv.-Doz. Dr. U. Rauen für die Hilfestellung bei den Zellexperimenten und Herrn Dr. M. Kirsch für seine interessanten Diskussionsbeiträge und die Möglichkeit, mit dieser Arbeit einen Beitrag zu seiner Forschung zu leisten.

den Herren H. Bandmann, W. Karow und R. Poppek für die Aufnahme zahlreicher NMR-, Massen- und IR-Spektren, Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp für die Durchführung der Elementaranalysen und Frau U. Nüchter für die Hilfestellung bei der Aufnahme der Fluoreszenz- und UV-Spektren.

meinem Mann, Dr. Michael Stenert für seine Geduld und die fachliche wie persönliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit in hohem Maße beigetragen hat.

*Für meine Familie*

„Hiermit bestätige ich, die Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.“

## **Lebenslauf**

### ***Persönliche Daten***

Name	Verena Christine Stenert, geb. Gollnick
Geburtstag	20.09.1969
Geburtsort	Hamm (Westfalen)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

### ***Schulausbildung***

1976 – 1980	Carl-Orff-Grundschule, Hamm-Rhynern
1980 – 1986	Marien-Realschule, Hamm
1986 – 1987	Elisabeth-Lüders-Schule, Hamm
1990 – 1991	Fachoberschule für Technik, Dortmund Fachabitur Chemie

### ***Ausbildung und Berufstätigkeit***

1987-1989	Lehranstalt zur Ausbildung als MTA, WWU Münster
1989	St. Josef Hospital, Olsberg
1990	Veterinäruntersuchungsamt, Münster

### ***Hochschulausbildung***

1991	Immatrikulation im Fachbereich Chemie der Universität GH Essen
1991 – 1994	Grundstudium Abschluss: Vordiplom
1994 – 1998	Hauptstudium, Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie bei Prof. Dr. G. Schön, Thema: „Untersuchungen zum Ladungstransport in geordneten und ungeordneten Netzwerken von Halbleiterpartikeln“ Abschluss: Diplom-Chemikerin
1998	Beginn der Promotion am Institut für Organische Chemie bei Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Chemische und biologische Quellen für Stickstoffmonoxid .....	2
1.2 Biologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid.....	6
1.3 Chemische Eigenschaften und Reaktivität von Stickstoffmonoxid .....	8
1.4 NO-Nachweis durch Fluoreszenzspektroskopie und –mikroskopie .....	12
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>22</b>
<b>3 Optimierung der FNOCT-Synthese .....</b>	<b>24</b>
3.1 Substitution.....	26
3.2 Aldolkondensation und Diels-Alder-Reaktion .....	28
3.3 Photolyse.....	31
3.4 Zusammenfassung.....	33

<b>4 Versuche zur Darstellung neuer o-Chinodimethansysteme .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Syntheseversuche für einen Fluoreszenzmarker mit         Triphenylen als Fluorophor .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Versuche zur Variation der Position des Substituenten         im FNOCT-Molekül.....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Nitrierung .....	41
4.2.2 Reduktion und Methylierung .....	43
4.2.3 Aldolkondensation und Diels-Alder-Reaktion .....	45
4.2.4 Photolyse .....	51
<b>4.3 Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>5 Eigenschaften und Anwendung von FNOCT 7 .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2 Eigenschaften des Fluoreszenzmarkers FNOCT 7.....</b>	<b>51</b>
5.2.1 Reaktion mit Stickstoffmonoxid .....	61
5.2.2 Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren .....	63
5.2.3 Spezifität des Nachweisreagenz .....	68
5.2.4 Wirkung des Lösungsmittels .....	69
5.2.5 Lagerstabilität.....	71
5.2.6 Untersuchung der Toxizität .....	72



---

<b>5.3 Neuere Anwendungen der FNOCT-Methode.....</b>	<b>77</b>
5.3.1 Allgemeine Untersuchungen zum Zerfall von N-Diazeniumdiolaten (NONOaten).....	78
5.3.2 Untersuchung der Reaktion von Superoxid mit Stickstoffmonoxid mittels Fluoreszenzspektroskopie .....	82
5.3.3 Untersuchung der Reaktion von Ascorbinsäure und Sauerstoff mit Stickstoffmonoxid.....	87
5.3.4 Untersuchung des Zerfalls von Angelis Salz.....	103
<b>5.4 Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
 <b>6 Ausblick .....</b>	 <b>111</b>
 <b>7 Experimenteller Teil .....</b>	 <b>116</b>
<b>7.1 Allgemeine Arbeitstechnik .....</b>	<b>116</b>
7.1.1 Arbeiten unter Schutzgas.....	116
7.1.2 Verwendete Chemikalien .....	116
7.1.3 Besondere Apparaturen und Laborgeräte.....	118
7.1.4 Instrumentelle Analytik.....	119
<b>7.2 Optimierung und Neusynthese der phenanthren-haltigen         o-chinoiden Fluoreszenzmarker .....</b>	<b>121</b>
7.2.1 Darstellung von 2- und 4-Nitrophenanthren- 9,10-chinon ( <b>2</b> ) und ( <b>26</b> ) .....	121
7.2.2 Synthese von 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon ( <b>29</b> ) .....	124
7.2.2.1 Synthese von 9,10-Diaminophenanthren ( <b>28</b> ).....	124

7.2.2.2 Acetylierung und Nitrierung von 9,10-Diaminophenanthren ...	125
7.2.3 Syntheseoptimierung für 2-Aminophenanthren-9,10-chinon ( <b>3</b> ) .....	127
7.2.4 Synthese von 4-Aminophenanthren-9,10-chinon ( <b>9</b> ).....	128
7.2.5 Synthese von 3-Aminophenanthren-9,10-chinon ( <b>17</b> ).....	130
7.2.6 Syntheseoptimierung für N,N-Dimethyl-2-amino- phenanthren-9,10-chinon ( <b>4</b> ) .....	132
7.2.7 Synthese von N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon ( <b>32</b> )....	134
7.2.8 Synthese von N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-chinon ( <b>33</b> )....	136
7.2.9 Syntheseoptimierung für 2,5-Diphenyl-3,4-(2-dimethylamino-2,2'- biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on ( <b>5</b> ) .....	138
7.2.10 Synthese von 2,5-Diphenyl-3,4-(4-dimethylamino-2,2'- biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on ( <b>34</b> ) .....	140
7.2.11 Synthese von Chlormethylacetat .....	141
7.2.12 Synthese von Norborn-5en-2,3-( <i>E</i> )-dicarbonsäuredimethylester .....	142
7.2.13 Synthese von Norborn-5en-2,3-( <i>E</i> )-dicarbonsäure .....	143
7.2.14 Synthese von Norborn-5en-2,3-( <i>E</i> )-dicarbonsäurediacetoxy- methylester .....	144
7.2.15 Syntheseoptimierung für 3,5-Diphenyl-3,5-(2-dimethyl- amino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]- decan-4-on-8,9-( <i>E</i> )-dicarbonsäure ( <b>6</b> ) .....	145
7.2.16 Synthese von 3,5-Diphenyl-3,5-(4-dimethyl- amino-9,10-phenanthrylen)- tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]- decan-4-on-8,9-( <i>E</i> )-dicarbonsäure ( <b>35</b> ) .....	148

7.2.17 Syntheseoptimierung für 3,5-Diphenyl-3,5-(2-dimethyl- amino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decan-4-on-8,9-( <i>E</i> )- dicarbonsäurediacetoxymethylester ( <b>6e</b> ) .....	150
7.2.18 Syntheseoptimierungen für 3,6-Diphenyl-4,5-(2-dimethylamino-2,2'-bi- phenylen)-tricyclo[6.2.1.0 <sup>2,7</sup> ]undeca-3,5-dien-9,10-( <i>E</i> )-dicarbonsäure- ( <i>FNOCT-Säure</i> ) und diacetoxymethylester ( <i>FNOCT-Ester</i> ) ( <b>7</b> ) und ( <b>7e</b> ) .....	153
7.2.19 Synthese von 3,6-Diphenyl-4,5-(4-dimethylamino-2,2'-biphenylen)- tricyclo[6.2.1.0 <sup>2,7</sup> ]undeca-3,5-dien-9,10-( <i>E</i> )-dicarbon säure ( <b>11</b> ).....	155
<b>7.3 Syntheseveruche für einen triphenylen-haltigen o-chinoiden Fluoreszenzmarker .....</b>	<b>158</b>
7.3.1 Synthese von 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopenta- 2,4-dien-1-on ( <b>12</b> ) .....	158
7.3.2 Synthese von Dichlorvinylencarbonat (DCVC) ( <b>21</b> ) .....	159
7.3.2.1 Chlorierung von Ethylencarbonat.....	159
7.3.2.2 Darstellung von aktiviertem Zinkstaub nach LeGoff.....	160
7.3.2.3 Umsetzung von Tetrachlorethylencarbonat zu DCVC.....	160
7.3.3 Synthese von 1,4-Diphenyl-5,6-phenanthrylen-(bicyclo[2.2.1]heptan-7- on)-2,3-dichlor-2,3-diolcarbonat ( <b>13</b> ) .....	161
7.3.4 Syntheseveruch für 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3- diolcarbonat ( <b>14</b> ).....	163
7.3.5 Synthese von 1,4-Diphenyl-5,6-phenanthrylen-(bicyclo[2.2.1]- heptan-7-on)-2,3 diolcarbonat ( <b>22</b> ) .....	164

7.3.6 Syntheseveruche für 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3- diolcarbonat ( <b>14</b> ) .....	166
7.3.6.1 Versuch der thermischen Decarbonylierung .....	166
7.3.6.2 Versuch der photochemischen Decarbonylierung.....	166
<b>7.4 Experimente zu Eigenschaften und Anwendungen .....</b>	<b>168</b>
7.4.1 Verwendete Biochemikalien und Chemikalien .....	168
7.4.1.1 Ansatz des Phosphatpuffers .....	168
7.4.2 Ansatz von Stamm- und Messlösungen für die fluoreszenz- spektroskopischen Messungen.....	169
7.4.3 Messungen mit der NO-Elektrode.....	170
7.4.4 Vitalitätstests.....	170
7.4.4.1 Verwendete Zellen und Zelllinien .....	170
7.4.4.2 Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien .....	171
7.4.4.3 Sonstige Zusätze .....	171
7.4.4.4 Durchführung .....	171
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
8.1 Übersichtsartikel .....	173
8.2 Spezielle Literatur.....	173

## Abkürzungsverzeichnis

cGMP	zyklisches Guaosin-3',5'-monophosphat
DAF	2,3-Diaminofluoreszein
DAN	2,3-Diaminonaphthalin
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing-Faktor
FNOCT	Fluoreszent Nitric Oxide Cheletropic Trap
GC	Guanylat-Zyklase
GPT	Guanosin-5'-triphosphat
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MAHMA/NO	(Z)-1-[N-Methyl-N-(6-(N-methylammoniohexyl)amino)]diazan-1-ium-1,2-diolat
NAD / NADH	Nicotinamid-Adenindinucleotid / reduzierte Form
NMDA	N-Methyl-D-aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOCT	Nitric Oxide Cheletropic Trap
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxide synthase)
PAPA/NO	(Z)-1-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat
SIN-1	3-Morpholino-sydnonimin-hydrochlorid
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
Spermin/NO	(Z)-1-[N-(3-Aminopropyl)-N-[4-(3-aminopropylammonio)-butyl]-amino]diazan-1-ium-1,2-diolat
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl

## Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Optimierung der Synthese der bereits existierenden o-chinoiden Fluoreszenzmarker (FNOCT<sup>a</sup> und FNOCT/AM<sup>b</sup>) vorgenommen. Hierbei konnten die Produktmengen der einzelnen Reaktionsschritte bei gleichbleibenden oder besseren Ausbeuten um ein vielfaches erhöht werden. Somit liegt nun ein vereinfachtes Syntheseverfahren zur Herstellung der FNOCT-Vorstufen vor, die in einem letzten Photolyseschritt zum Fluoreszenzmarker umgesetzt werden können. Die Bedingungen für die Photolyse konnten vor allem hinsichtlich der Reaktionszeit, die von über 60 h auf ca. 20 h gesenkt wurde, optimiert werden.

Durch Variation der Position des Substituenten am Phenanthrengerüst der Marker-Verbindung konnte ein neues FNOCT-Derivat<sup>c</sup> synthetisiert werden, welches ebenfalls in der Lage ist, Stickstoffmonoxid unter Anstieg der Fluoreszenz zu binden. Somit steht für den NO-Nachweis eine weitere Fänger-Verbindung zur Verfügung. Eine bathochrome Verschiebung des Maximums der Anregungswellenlänge des NO-Adduktes (Hydroxylamin) konnte für diese Verbindung nicht beobachtet werden. Das Fluoreszenzanregungsspektrum dieser Verbindung weist jedoch eine Schulter bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$  auf, die eine nur wenig geringere Fluoreszenzintensität zeigt als das Maximum. So kann bei dieser Wellenlänge angeregt werden, wodurch das gleiche Emissionsspektrum wie bei Anregung im Maximum erhalten wird, was dann einer bathochromen Verschiebung der Anregungswellenlänge gleich kommt.

Die Eigenschaften der Fluoreszenzmarker, insbesondere die der von MEINEKE entwickelten Verbindungen, wurden weitergehend untersucht. Vor allem die Wirkung

---

<sup>a</sup> 3,6-Diphenyl-4,5-(2-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(E)-dicarbonsäure (Entwicklung MEINEKE)

<sup>b</sup> 3,6-Diphenyl-4,5-(2-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(E)-dicarbonsäure diacetoxymethylester (Entwicklung MEINEKE)

<sup>c</sup> 3,6-Diphenyl-4,5-(4-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(E)-dicarbonsäure

unterschiedlicher Lösungsmittel, die Toxizität und die Lagerstabilität sowie die Spezifität der Fänger gegen  $\text{NO}^-$  und das Superoxidradikal  $\text{O}_2^{\bullet-}$  wurden bestimmt.

In diesem Zusammenhang wurde die Bildung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  aus  $\text{O}_2$  durch Tetrahydrobiopterin sowie die Reaktion des Superoxidradikals mit NO untersucht. NO kann bei gleichzeitiger Freisetzung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nicht nachgewiesen werden, was für die Bildung von Peroxynitrit spricht.  $\text{NO}^-$  wird aus Angelis Salz gebildet, kann aber durch FNOCT in sauerstoffhaltiger und sauerstofffreier Lösung nachgewiesen werden. Dies legt eine Reaktion von FNOCT mit  $\text{NO}^-$  nahe, ein endgültiger Beweis konnte allerdings mittels Fluoreszenzspektroskopie nicht erbracht werden.

Die Untersuchung des Zerfalls von Diazeniumdiolaten (NONOate) gehört zu den wichtigen Anwendungen fluoreszenzspektroskopischer Nachweismethoden. Mit FNOCT konnte trotz komplizierter Reaktionskinetik des Systems sowohl die Menge an freigesetztem NO wie auch die Halbwertszeit der NONOate gut abgeschätzt werden. Auch der Verbleib von NO, z. B. durch Reaktion mit Sauerstoff, konnte ermittelt werden.

In Messsystemen, die zugleich Ascorbinsäure und Sauerstoff enthielten, wurde ein geringerer NO-Spiegel und eine im Gegensatz zur Reaktion von NO mit Sauerstoff veränderte Reaktionskinetik gefunden. Dies zeigt, dass Ascorbinsäure im Zusammenhang mit  $\text{O}_2$  mit Stickstoffmonoxid reagiert. Vorschläge für den zugrunde liegenden Mechanismus wurden formuliert, konnten jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht vollständig bewiesen werden.

# 1 Einleitung

Das früher überwiegend als Edukt für die Salpetersäure-Synthese und als unerwünschte Verunreinigung der Luft bekannte Radikal Stickstoffmonoxid (NO) hat in den vergangenen Jahren in Biologie und Medizin stark an Bedeutung gewonnen. Dies beruhte vor allem auf den Forschungsergebnissen der amerikanischen Wissenschaftler FURCHGOTT (New York), MURAD (Houston) und IGNARRO (Los Angeles), die in den 80er Jahren entdeckten, dass Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im menschlichen und tierischen Organismus spielt. Sie erhielten 1998 für ihre Forschung den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.<sup>[1-3]</sup> Dadurch wurde in den 90er Jahren ein Boom an Forschungsarbeiten und Veröffentlichungen auf dem Gebiet der physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid ausgelöst.<sup>[4-10]</sup> An die 4000 Arbeiten und Reviews über Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen allein im Jahr 2001 beweisen, dass das Interesse am „Molecule of the Year“ des Jahres 1992<sup>[11]</sup> noch immer nicht erschöpft ist. Mit der Erforschung seiner biologischen Wirkungsweise ging die Entwicklung von Nachweismethoden für Stickstoffmonoxid einher. Diese sind meist indirekter Natur, was bedeutet, dass NO nicht direkt, sondern durch Folgeprodukte (z.B. Nitrit oder Nitrat) nachgewiesen werden kann.<sup>[6,12-14]</sup> Nur wenige Methoden eignen sich bislang zum direkten Nachweis von Stickstoffmonoxid. Hierzu zählt neben ESR-Methoden<sup>[15]</sup> und der polarographischen Detektion mit sogenannten NO-Elektroden<sup>[16-19]</sup> der Einsatz von speziellen Fluoreszenzfarbstoffen.<sup>[20,21]</sup> In Hinblick auf die physiologische Wirksamkeit des Moleküls wurden Stickstoffmonoxid-Donatoren entwickelt, die in biologischen Systemen unter physiologischen Bedingungen NO freisetzen und ihren Einsatz als Medikamente finden können oder bereits fanden.<sup>[22]</sup>



## 1.1 Chemische und biologische Quellen für Stickstoffmonoxid (NO)

Quellen für Stickstoffmonoxid sind vor allem Verbrennungsprozesse. So wird das Radikal bei der Verbrennung organischer Materialien freigesetzt, und ist daher unter anderem Bestandteil von Autoabgasen oder Emissionen aus Heizungsanlagen.<sup>[23]</sup> Großtechnisch wird NO für die Synthese von Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) hergestellt. Bei diesem als Ostwald-Verfahren<sup>[24]</sup> bekannten Prozess werden Ammoniak und Luft bei 600-700°C platinkatalysiert verbrannt. Beim Abkühlen bildet sich dann mit überschüssiger Luft zunächst  $\text{NO}_2$ , welches zu  $\text{N}_2\text{O}_4$  dimerisiert und mit Wasser in Salpetersäure überführt wird. Im Labormaßstab wird NO durch Reduktion von Salpetersäure z.B. mit Kupfer gewonnen.<sup>[24]</sup>

In Hinblick auf pharmakologische Anwendungen wurden und werden organisch-chemische Substanzen entwickelt, die Stickstoffmonoxid gezielt freisetzen können. Man kann diese NO-Donatoren in drei Gruppen einteilen:

Zur ersten Gruppe zählen Substanzen, welche im Säugetierkörper auf reduktivem Wege unter NO-Bildung abgebaut werden; hierzu gehören z.B. Nitroverbindungen, wie Nitroglycerin und Isosorbiddinitrat. Erstes wird seit über 100 Jahren als Medikament bei Angina Pectoris eingesetzt.<sup>[25]</sup> Der Abbau-Mechanismus ist weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass Thiole hier eine übergeordnete Rolle spielen.<sup>[22]</sup>

Die zweite Substanzgruppe umfasst die Moleküle, die durch Oxidation Stickstoffmonoxid bilden können. Hierzu zählt beispielsweise 3-Morpholino-sydnonimin-hydrochlorid (SIN-1) (Abb. 1.1). Dieses Molekül führt in vitro neben der Bildung von Stickstoffmonoxid auch zur Freisetzung eines Superoxidradikalanions aus Sauerstoff, welches seinerseits mit NO zu Peroxynitrit weiterreagieren kann. Die therapeutisch eingesetzte Form des SIN-1 ist Molsidomin. Dieses wird in der Leber durch Esterasen enzymatisch hydrolysiert, wobei der Metabolit **SIN-1** entsteht. Durch Abspaltung von  $\text{OH}^-$  wird **SIN-1A** erhalten. Diese aktivierte Form von SIN-1 wird in vitro durch Sauerstoff oxidiert, wodurch  $\text{O}_2$  zum Superoxidradikalanion  $\text{O}_2^{\bullet-}$  reduziert wird.<sup>[22]</sup> Die auf diese Weise gebildete Zwischenstufe **Sin-1Z** liefert dann Stickstoffmonoxid und nach Abspaltung eines Protons ein „Hydrazon“.

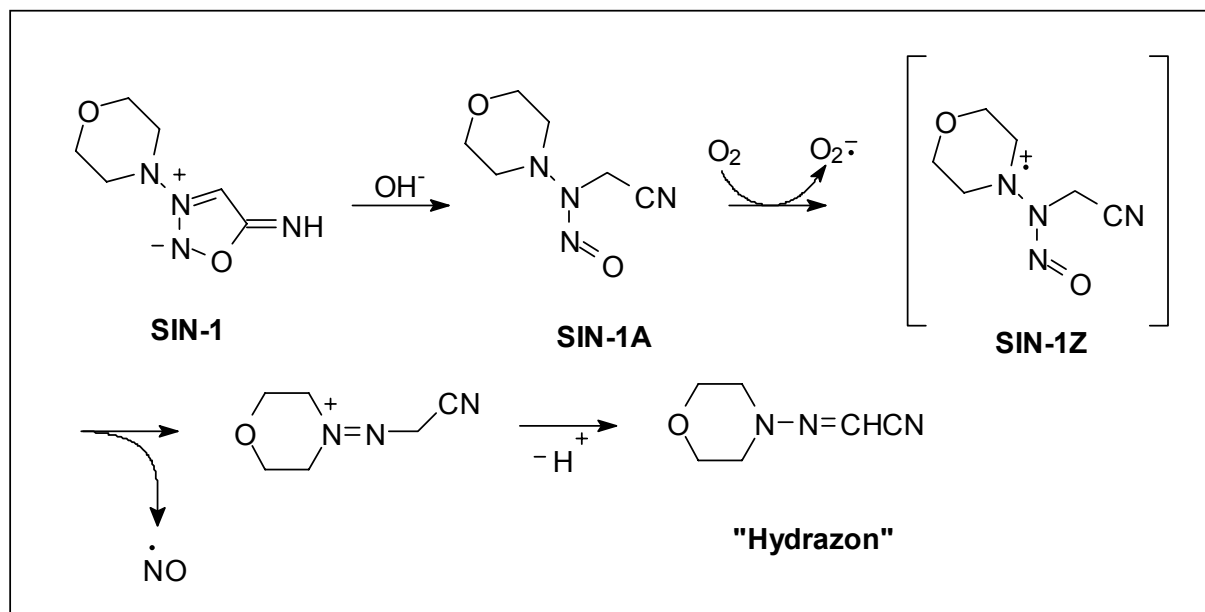


Abb 1.1: Freisetzung des Superoxidradikalanions und Abspaltung von Stickstoffmonoxid durch SIN-1.

In der dritten Gruppe können die Donatoren erfaßt werden, die spontan Stickstoffmonoxid freisetzen können, also bereits NO in ihrer Molekülstruktur vorgebildet enthalten. Hierzu zählt die große Substanzgruppe der „NONOate“ (1-substituierte-Diazen-1-ium-1,2-diolate), der z.B. das MAHMA-NONOat<sup>a</sup> (MAHMA/NO) oder das SperminNONOat<sup>b</sup> (SPER/NO) angehören. Diese Substanzen zerfallen durch Erhöhung der Temperatur oder durch Veränderung des pH-Wertes ihrer Lösungen. Dabei sind sie im basischen Milieu stabil, zerfallen aber in neutraler oder saurer Lösung unter Bildung von NO und eines Restmoleküls, bei welchem es sich meist um das Ausgangsamin handelt. Je nach ihrer Struktur besitzen N-Diazeniumdiolate unterschiedliche Halbwertszeiten. Diese reichen von wenigen Minuten (z.B. MAHMA/NO:<sup>[26]</sup> 1 min bei 37°C) bis hin zu vielen Stunden (z. B. DETA/NO:<sup>[27]</sup> 20 - 23 h bei 37°C). Die Strukturen einiger wichtiger NONOate zeigt Abbildung 1.2. Abgebildet sind hier MAHMA/NO, SPER/NO, PAPA/NO<sup>c</sup> und

<sup>a</sup> (Z)-1-[N-Methyl-N-(6-(N-methylammoniohexyl)amino)]diazen-1-ium-1,2-diolat

<sup>b</sup> (Z)-1-[N-(3-Aminopropyl)-N-[4-(3-aminopropylammonio)-butyl]-amino]diazen-1-ium-1,2-diolat

<sup>c</sup> (Z)-1-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolat

DETA/NO<sup>d</sup> als Beispiele, von denen einige in dieser Arbeit näher untersucht werden sollen.

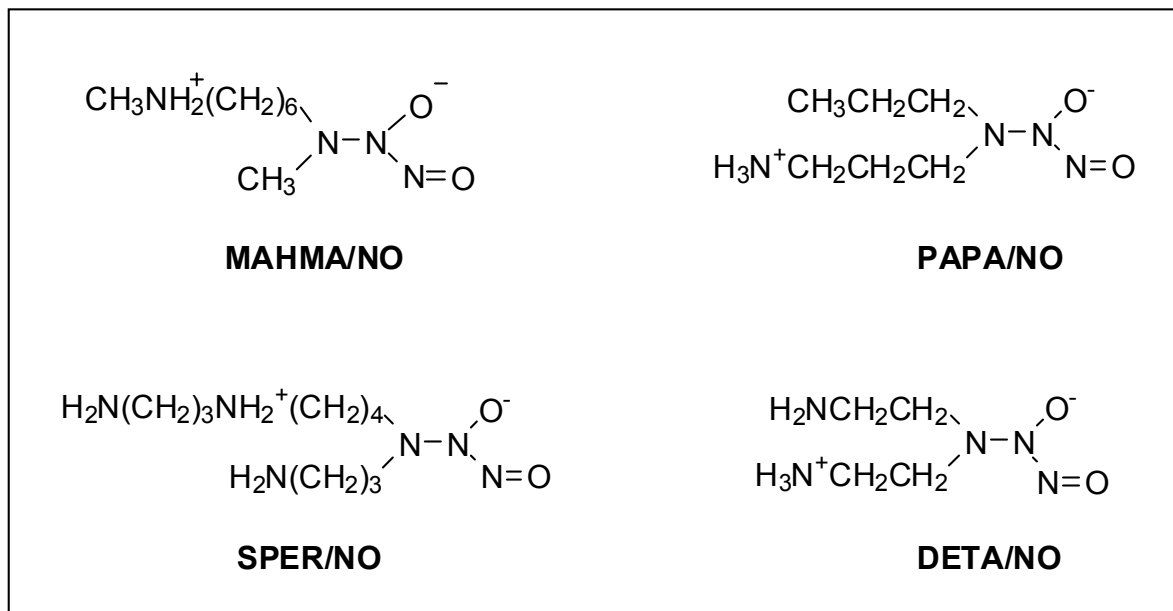


Abb. 1.2: Beispiele für NONOate: MAHMA/NO, Sper/NO, PAPA/NO und DETA/NO.

Auch die S-Nitrosothiole können zur Gruppe der spontan zerfallenden NO-Donatoren gezählt werden, wobei sich ihr Zerfallsmechanismus bezüglich des Auslösers von den NONOaten unterscheidet. S-Nitrosothiole zerfallen durch Einwirkung von Übergangsmetallionen wie Kupfer,<sup>[28]</sup> aber es wird auch ein Einfluß von größeren Mengen an Ascorbinsäure diskutiert.<sup>[29]</sup> Zu dieser Gruppe gehören z.B. S-Nitroso-glutathion<sup>[30]</sup> (GSNO) oder S-Nitroso-N-acetylpenicillamin<sup>[31]</sup> (SNAP). Beide Strukturen sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Neben diesen beiden Verbindungen kennt man noch diverse weitere Nitrosothiole.

Für S-Nitrosothiole werden viele verschiedene Funktionen im Körper diskutiert. So wird angenommen, dass sie als NO-Speicher dienen. Denkbar ist aber auch die Verwendung als NO-Transportermolekül.<sup>[32]</sup> Es gibt ausserdem Hinweise darauf, dass Nitrosothiole eine Rolle bei der Atemkontrolle spielen.<sup>[33,34]</sup>

<sup>d</sup> (Z)-1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazan-1-ium-1,2-diolat

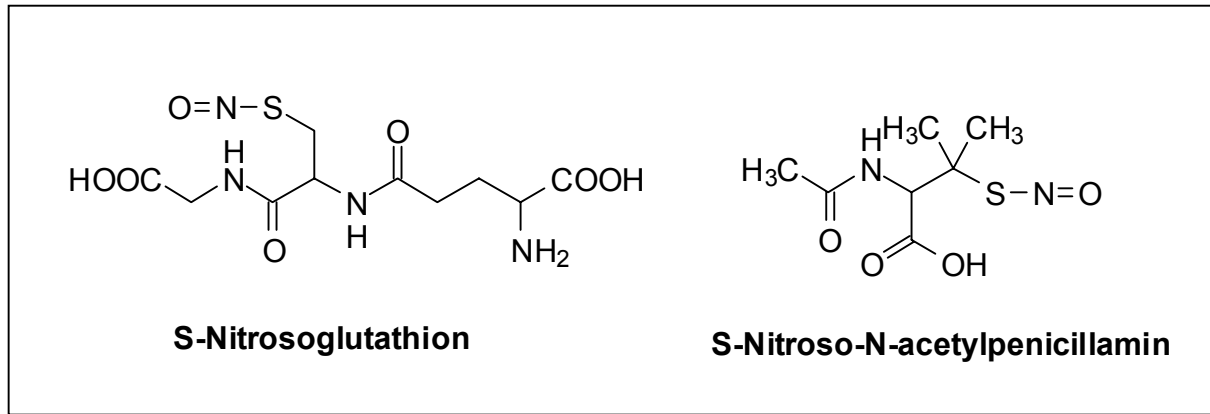


Abb. 1.3: Beispiele für Nitrosothiole: S-Nitrosoglutathion (GSNO) und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP).

Stickstoffmonoxid übt im Säugetierorganismus vielfältige Funktionen aus. Dies legt nahe, dass Zellen des Körpers in der Lage sein müssen, NO selbst zu synthetisieren. Die Biosynthese<sup>[35]</sup> (siehe Abbildung 1.4) verläuft enzymatisch, katalysiert durch die NO-Synthase (NOS). L-Arginin wird unter Einfluß von NOS in Anwesenheit von Sauerstoff und einem Äquivalent NADPH in einem ersten Syntheseschritt zu N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-arginin umgesetzt. Dieses reagiert mit einem halben Äquivalent NADPH und Sauerstoff unter NOS-Katalyse weiter zu L-Citrullin und NO.

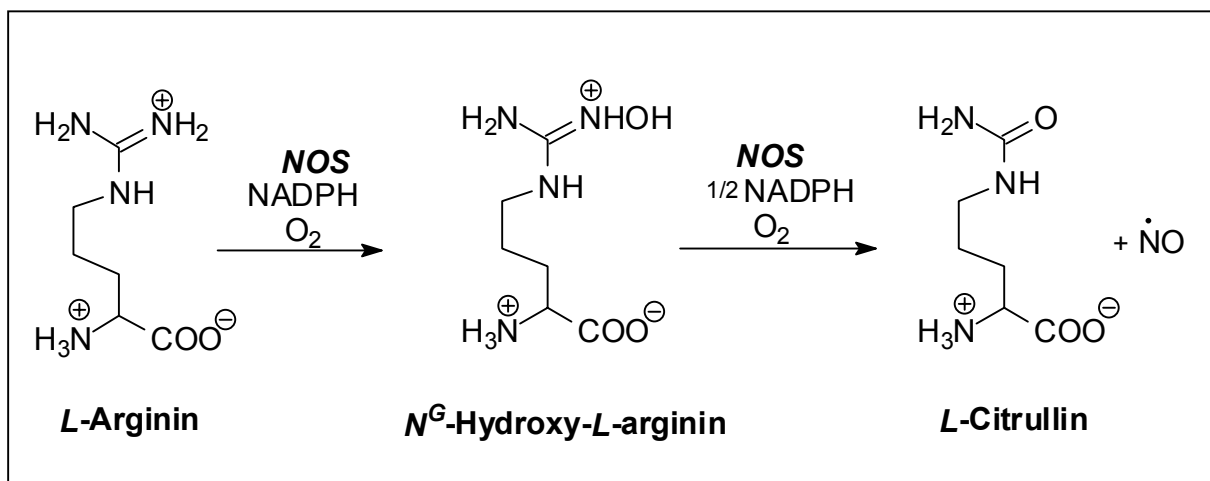


Abb. 1.4: Bildung von Stickstoffmonoxid bei der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin durch NO-Synthase (NOS).

Die Verfügbarkeit des Substrates *L*-Arginin ist über einen Kreislauf geregelt. Diese Aminosäure gelangt durch Kationenkanäle oder als Peptid gebunden in die Zelle. Das nach der Enzymkatalyse gebildete *L*-Citrullin reagiert im Harnstoff-Zyklus zu *L*-Argininsuccinat, welches anschliessend als *L*-Arginin-Lieferant zur Verfügung steht.<sup>[36]</sup>

Die NO-Freisetzung verläuft für jeden Zelltyp unterschiedlich. In Makrophagen liegt normalerweise keine NOS vor. Wirken Stimulatoren wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder  $\gamma$ -Interferon auf die Zelle, so nimmt der Zellkern die Produktion der NO-Synthase auf. Diese Isoform der Makrophagen-NOS wird deshalb auch als induzierbare NOS (iNOS) bezeichnet. Die gebildete NO-Synthase kann nun mit der NO-Produktion beginnen.

Anders als bei den Immunzellen liegt die NO-Synthase in den Endothelzellen der Gefäßwände und Neuronen bereits vor. Diese als endotheliale, konstitutive (eNOS) und neuronale, konstitutive NOS (nNOS) bezeichneten Isoformen des Enzyms werden durch Faktoren, die auf die Zelle wirken, zur NO-Produktion angeregt. Bei Endothel- bzw. Neuronalzellen wird die NO-Synthase durch einen Calcium/Calmodulin-Komplex aktiviert.<sup>[37]</sup> Dieser wird gebildet, wenn Calcium in die Zelle einströmt. Bei Neuronen wird dies durch den Neurotransmitter Glutamat bewirkt. Dieses wird von der Synapse freigesetzt und bindet an die postsynaptischen NMDA-Rezeptoren (*N*-Methy-D-aspartat-Rezeptoren). Durch diese Ionenkanäle kann Calcium in die postsynaptische Nervenzelle einströmen und auf die NOS wirken. Bei den Endothelzellen der Gefäßwände können mehrere Faktoren den Calciumeinstrom bewirken. Acetylcholin wirkt ähnlich wie Glutamat und öffnet Ionenkanäle. Auch Serotonin, das bei Aggregation von Blutplättchen frei wird, und die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes bewirken den Eintritt von Calcium in die Zelle und dadurch die Aktivierung der NOS über Komplexbildung mit Calmodulin.

## 1.2 Biologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid

Da Stickstoffmonoxid einerseits ein giftiges Gas ist, andererseits aber von unterschiedlichen Zelltypen des Organismus gebildet wird, ist das Molekül hinsichtlich seiner physiologischen-, aber auch bezüglich seiner patho-

physiologischen Wirkung interessant. Als Teil des Immunsystems wird NO in den Makrophagen gebildet. Auslöser sind Lipopolysaccharide (LPS), Endotoxine eingedrungener Bakterien oder  $\gamma$ -Interferon, das von Tumorzellen gebildet wird. Das von den Makrophagen freigesetzte NO wirkt zytotoxisch auf die Bakterien oder Tumorzellen. Diese sterben ab und können anschließend phagozytiert werden. Bei starkem Bakterienbefall mit Endotoxinbildung können auch Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören, NO-Synthasen bilden. Dies führt wie bei den Makrophagen zur Expression großer NO-Mengen und damit zur Vasodilatation, was wiederum Hypotension zur Folge hat. Das sich ergebende Krankheitsbild wird dann als „Septischer Schock“ bezeichnet und kann zum Tode führen.<sup>[38]</sup>

In den Endothelzellen der Blutgefäße ist Stickstoffmonoxid von IGNARRO als der EDRF (**E**ndothelium-**D**erived-**R**elaxing-**F**aktor) identifiziert worden. Gebildet durch die Calcium/Calmodulin-aktivierte eNOS dringt das Molekül in die unter dem Endothel liegenden glatten Muskelzellen der Gefäßwand ein und aktiviert die lösliche Guanylat-Zyklase (GC). Diese katalysiert die Umsetzung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). cGMP führt zur Vasodilatation durch Relaxation der Gefäßmuskulatur. Die Diffusion von NO durch die Gefäßwand in die Blutbahn führt zur Aktivierung der GC der Blutplättchen, welche die Plättchenaggregation hemmt.<sup>[5,9]</sup>

Die Wirkung von NO im Zentralnervensystem (ZNS) ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Wirkung als „retrograder“ Botenstoff wird diskutiert. Feststellbar sind erhöhte NO-Werte bei Gehirnerkrankungen. Es wird auch vermutet, dass Stickstoffmonoxid zur Zellschädigung bei chronischen Entzündungen und Schlaganfällen führt. Diskutiert wird auch eine Beteiligung bei der Alzheimer'schen und Parkinson'schen Krankheit.<sup>[5,9]</sup>

Bei kardiovaskulären Erkrankungen (z. B. Angina Pectoris) kann die Gabe von NO-freisetzenden Substanzen hilfreich sein, da hierdurch verengte Gefäße erweitert werden, was zum Blutdruckabfall und damit zum Abklingen der Beschwerden führt.<sup>[9,39]</sup>

### 1.3 Chemische Eigenschaften und Reaktivität von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist das einfachste, thermisch stabile Molekül mit ungerader Elektronenzahl (Radikal), das bekannt ist. Aus diesem Grunde wurde sowohl seine elektronische Struktur, wie auch seine chemische Reaktivität eingehend untersucht.<sup>[40]</sup> NO ist ein farbloses, monomeres, paramagnetisches Gas mit sehr niedrigem Schmelz- und Siedepunkt<sup>e</sup>. Oberhalb von 1100 °C zerfällt es in die Elemente N<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>. Die Bindungsverhältnisse können mit Hilfe eines Molekülorbitaldiagramms veranschaulicht werden. Abbildung 1.5<sup>[41]</sup> zeigt das Molekülorbitaldiagramm von Stickstoffmonoxid im Grundzustand. Erkennbar ist, dass NO im Gegensatz zu N<sub>2</sub> oder CO, die ansonsten identische Molekülorbitale haben, ein zusätzliches Elektron in einem antibindenden  $\pi^*$ -Orbital aufweist. Dies führt zu einer Verminderung der Bindungsordnung von 3 auf ~2,5 und erklärt, warum der Bindungsabstand im NO-Molekül (115 pm) zwischen dem von dreifach gebundenem NO<sup>+</sup> (106 pm) und NO-Derivaten mit doppelt gebundenem Stickstoff (~120 pm) liegt. Auch die geringe Ionisierungsenergie von 9,25 eV ist so zu erklären.

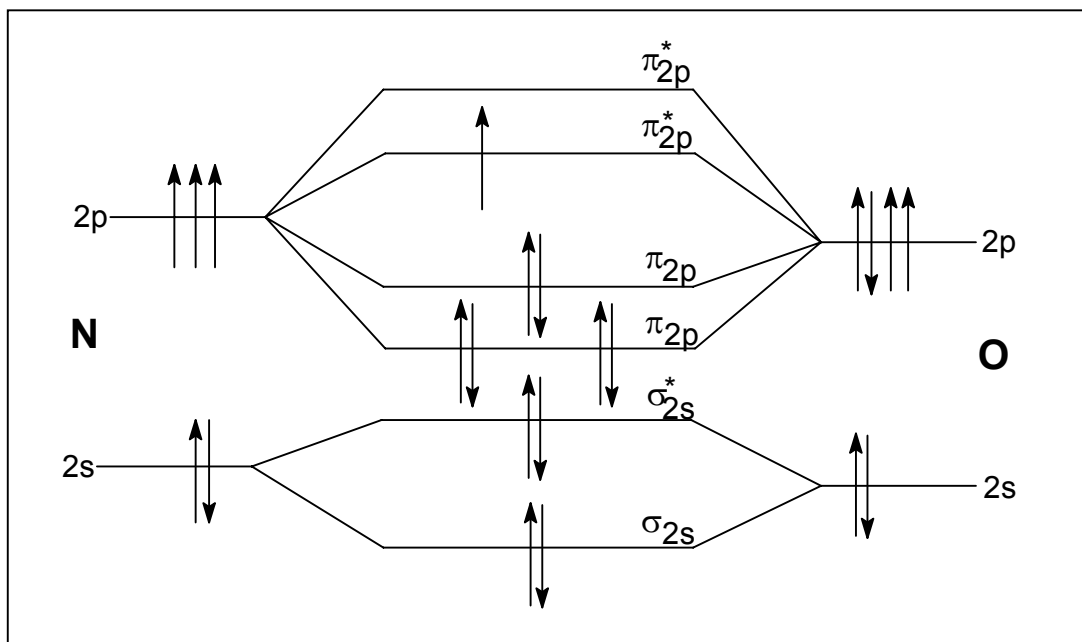


Abb. 1.5: Molekülorbital-Diagramm von NO im Grundzustand.<sup>[41]</sup>

<sup>e</sup> Schmelzpunkt: -163,6 °C; Siedepunkt: -151,8 °C

Stickstoffmonoxid zeigt eine sehr geringe Dimerisationsneigung. Dies ist auf die Delokalisation des ungepaarten Elektrons über das gesamte Molekül zurückzuführen, so dass eine Dimerisierung zu  $\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{O}=\text{N}-\text{N}=\text{O}$ ) keine Änderung der Bindungsordnung bewirkt.

Der Zerfall von NO ist bezüglich der Disproportionierung (1) kinetisch gehindert, weshalb das Gas bei Normaldruck und Raumtemperatur ohne detektierbare Zersetzung lagerbar ist.

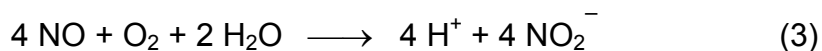


Bei steigendem Druck kann die Disproportionierung stattfinden, was bei der Abfüllung in Druckgasflaschen beachtet werden muß. Der Anstieg an  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{NO}_2$  beträgt jedoch nur ca. ein Prozent pro Monat<sup>[42]</sup>.

Eine - vor allem im Hinblick auf NO-Detektion in vitalen Organismen - wichtige Reaktion ist die Umsetzung von Stickstoffmonoxid mit Sauerstoff. In der Gasphase (2) findet eine Oxidationsreaktion dritter Ordnung statt. Diese ist erster Ordnung in  $c(\text{O}_2)$  und zweiter Ordnung in  $c(\text{NO})$ :



Mit dem gebildeten  $\text{NO}_2$  kann NO in einer reversiblen Folgereaktion zu  $\text{N}_2\text{O}_3$  weiter reagieren. In wässriger Lösung wurde eine etwas andere Stöchiometrie für Reaktion (2) gefunden.<sup>[43]</sup>



Für Reaktion (2) wurden u.a. von AWAD und STANBURY<sup>[44]</sup> die kinetischen Daten bestimmt. Das Geschwindigkeitsgesetz hat die Form

$$-\text{d}[\text{O}_2] / \text{d}t = k [\text{NO}]^2 [\text{O}_2] \quad (4)$$

mit  $k = 2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$  bei 25 °C. Dieses Gesetz gilt bei pH-Werten von 1-13. Anscheinend spielen Lösungsmittelleffekte eine untergeordnete Rolle bei dieser Reaktion. Eine Reaktion mit Wasser findet so gut wie nicht statt. Darüber hinaus



wurden von GRÄTZEL, HENGLEIN und weiteren Autoren die Geschwindigkeitskonstanten sowohl für die Reaktion zu  $\text{N}_2\text{O}_3$  ( $\text{NO} + \text{NO}_2$ ) und  $\text{N}_2\text{O}_4$  ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_2$ ) als auch die der jeweiligen Rückreaktion bestimmt.<sup>[41]</sup> Bei der experimentellen Bestimmung des NO-Gehaltes, z. B. in biologischen Systemen, die naturgemäss immer Sauerstoff enthalten und in sauerstoffhaltigen Lösungen sollte beachtet werden, dass viele unterschiedliche Reaktionen des Stickstoffmonoxids mit Sauerstoff stattfinden können. Für eine Kalibrierung zur Bestimmung des NO-Gehaltes eines Systems sollten deshalb absolut sauerstofffreie Lösungsmittel verwendet werden.

Stickstoffmonoxid kann typische Radikalreaktionen eingehen. Beispielsweise kann mit NO eine Radikalkettenreaktion initiiert werden, es kann aber genauso als Inhibitor eingesetzt werden. Untersucht wurde auch die Abstraktion von Wasserstoffatomen z. B. aus Hydroxylamin<sup>[41]</sup> Eine weitere wichtige Reaktion ist die Rekombination mit anderen Radikalen. Hier ist z. B. die Umsetzung von NO mit dem Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) zu nennen, wobei Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gebildet wird. Dieses zerfällt in wässriger Lösung schnell mit 28 %iger Ausbeute in ein OH-Radikal und ein  $\text{NO}_2$ -Radikal<sup>[45]</sup>. Hauptprodukt bei  $\text{pH} \leq 7$  ist  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{HNO}_3$ ). Bei einem pH-Wert grösser 7 wird zunehmend auch  $\text{NO}_2^-$  und Sauerstoff gebildet. Da OH-Radikale im Säugetierorganismus zur Zellschädigung beitragen, ist die Bildung von Peroxynitrit höchst unerwünscht.

Die Ionisierungsenergie von NO ist mit 9.25 eV recht niedrig. Dies bedeutet, dass das einzelne Elektron leicht abgegeben werden kann. Durch diese Oxidationsreaktion entsteht das relativ stabile Nitrosoniumion  $\text{NO}^+$ , das häufig als reaktive Zwischenstufe bei Nitrosierungsreaktionen diskutiert wird.

Eine weitere wichtige Reaktion in diesem Zusammenhang ist die Reduktion von NO zum Nitrosylanion  $\text{NO}^-$ , welches als Singulett- und Triplett- $\text{NO}^-$  auftreten kann. Diese Reaktion ist durch eine positive Elektronenaffinität ( $\sim 0.84 \pm 0.05$  eV) und ein Reduktionspotential von  $-0.68$  V thermodynamisch begünstigt.<sup>[46,47]</sup> So liefern Oxidation und Reduktion zwei weitere reaktive Spezies, die im Organismus mit einer Vielzahl anderer Substanzen wechselwirken können.

Alle drei Oxidationsstufen des NO können beispielsweise mit Übergangsmetallen (M), wie z.B. Eisen Komplexe bilden, z. B. das Pentaquanitrosyleisen-Kation  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NO}]^{2+}$ , dass beim Nitritnachweis<sup>[48]</sup> als „brauner Ring“ gebildet wird.

In biologischen Systemen können eisenhaltige Proteine als Reaktionspartner dienen.<sup>[49]</sup> Thiole (RSH) können mit  $\text{NO}^+$  oder Peroxynitrit zu S-Nitrosothiolen (RS-NO) reagieren, während die Reaktion mit  $\text{NO}^-$  Hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) und ein Disulfid liefert. NO selbst reagiert primär nicht mit Thiolen. Einige Reaktionen von NO,  $\text{NO}^+$  und  $\text{NO}^-$  sind als Übersicht in Abbildung 1.6 dargestellt.

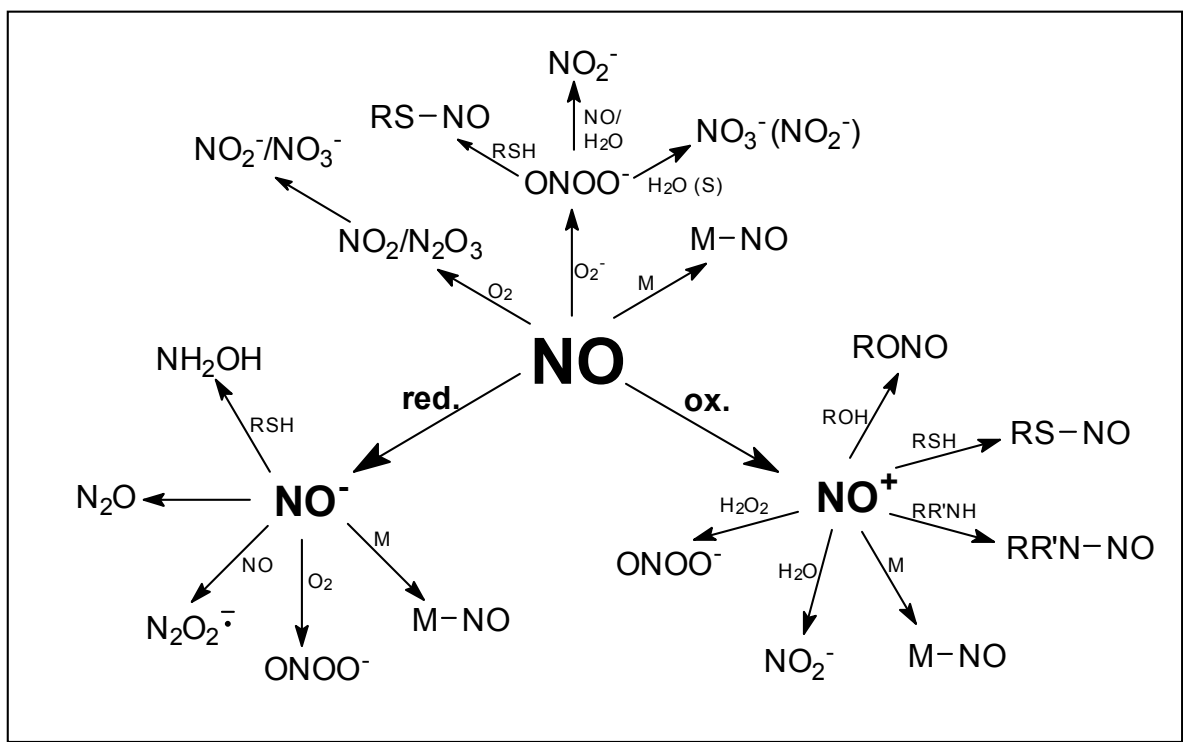


Abb. 1.6: Reaktionen von NO, seiner oxidierten ( $\text{NO}^+$ ) und reduzierten ( $\text{NO}^-$ ) Form in biologischen Systemen.<sup>[41]</sup>

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass es sich bei Stickstoffmonoxid um ein sehr reaktives Molekül handelt, dass selbst und dessen Reaktionsprodukte im biologischen System an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Aus diesem Grunde bestand und besteht weiterhin großes Interesse an der Aufklärung des NO-Metabolismus.

## 1.4 NO-Nachweis durch Fluoreszenzspektroskopie und - Mikroskopie

In der Vergangenheit wurden Untersuchungen zur Aufklärung des NO-Stoffwechsels entweder durch Betrachtung der Abnahme von Reaktanden oder Detektion von Reaktionsprodukten durchgeführt. Die Bestimmung der Nitrit- und Nitrat-Werte (beide Verbindungen entstehen als Folgeprodukte von NO) wird als Nachweismethode häufig angewandt. Hierzu zählen insbesondere Methoden, die auf Nitrosierungsreaktionen beruhen, wie z.B. die Griess-Reaktion<sup>[50]</sup> und die DAN-Methode (Diaminonaphthalin).<sup>[51,52]</sup> Bei beiden Reaktionen wird Nitrit in Gegenwart von Aminen im sauren Medium umgesetzt. Soll der Nitrat-Wert mitbestimmt werden, wird dieses zuvor enzymatisch zu Nitrit reduziert und dann als Summe bestimmt. Da beide Methoden nur für Messungen im Zellüberstand geeignet sind, wurde die DAN-Methode hinsichtlich ihrer Verwendung in lebenden Zellen durch Einsatz eines Fluorescein-Derivates als Fluorophor mit eingefügten Estergruppen modifiziert. So kann der als DAF (Diaminofluorescein) bezeichnete Farbstoff in die Zelle aufgenommen werden. Die Spaltung der Estergruppen durch Esterasen hat den Verbleib des negativ geladenen Restmoleküls in der Zelle zur Folge. Dies ermöglicht die Detektion von NO unter dem Fluoreszenzmikroskop.<sup>[53]</sup> In Abbildung 1.7 ist schematisch die Migration des Diacetats **DAF-FM DA** in eine Zelle dargestellt. Durch zelleigene Esterasen wird das Molekül hydrolysiert und so ein Dianion (**DAF-FM**) gebildet. Diese Verbindung kann durch  $\text{N}_2\text{O}_3$ , welches durch die Reaktion von NO mit  $\text{O}_2$  gebildet wird, zu einem fluoreszierenden Triazol (**DAF-FM T**) abreagieren.

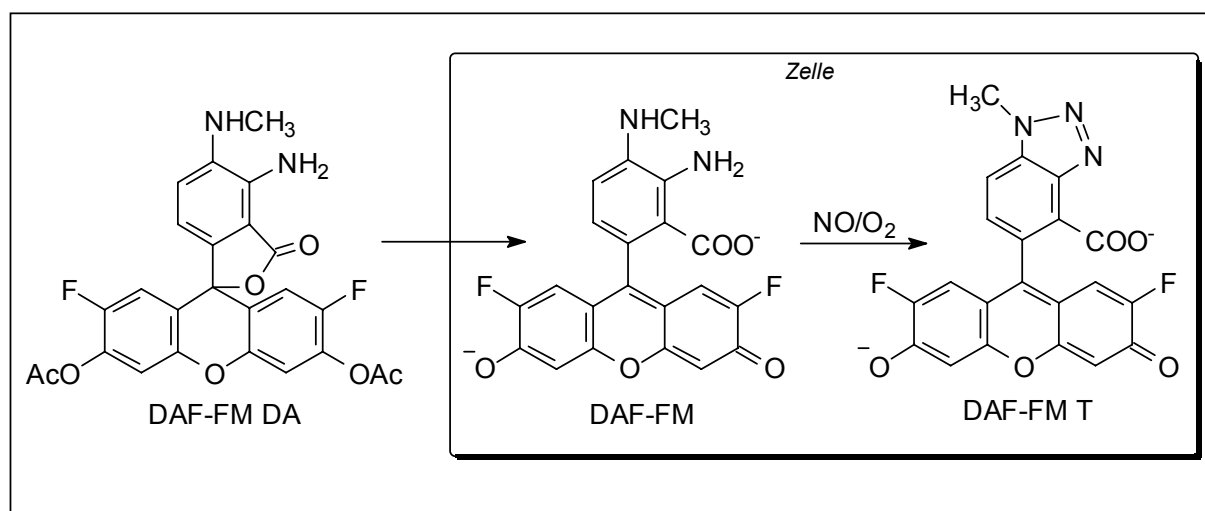


Abb. 1.4-1: DAF-FM DA migriert in die Zelle und wird durch Esterasen zu DAF-FM hydrolysiert, welches anschliessend mit NO unter Einwirkung von O<sub>2</sub> zur fluoreszierenden Spezies DAF-FM T reagiert.

Eine direkte Methode des NO-Nachweises ist der Einsatz eines Metallkomplexes (bezeichnet als **[Co(DATI-4)]**) mit fluoreszierenden Liganden.<sup>[21]</sup> Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven Dissoziation eines Liganden nach Einwirkung von NO. Von den zunächst durch die verzerrt tetraedrische Koordination am Cobalt-(II)-Zentralatom parallel zueinander stehenden Dansylgruppen wird eine durch Bindung von NO an Cobalt verdrängt. Bei einer Einstrahlungswellenlänge von  $\lambda = 350$  nm kann eine Fluoreszenz bei  $\lambda = 505$  nm detektiert werden. Der Ausgangskomplex fluoresziert nicht, was durch einen auf Grund der  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung der Fluorophore verursachten Eximer-Komplex und eventuell einen auf die unvollständig gefüllte d-Schale des [Co(DATI-4)]-Komplexes zurückgehenden Effekt erklärt wird. Die Nachweisgrenze der Methode wird mit 50 - 100  $\mu$ M angegeben, was allerdings weit über den oben genannten Methoden liegt, die Nachweisgrenzen bis in den nanomolaren Bereich aufweisen. Darüber hinaus steigt die Fluoreszenz des Cobalt-dinitrosylkomplexes lediglich auf das 4fache der Grundfluoreszenz an. Dieser Wert wird erst nach 6 h erreicht.

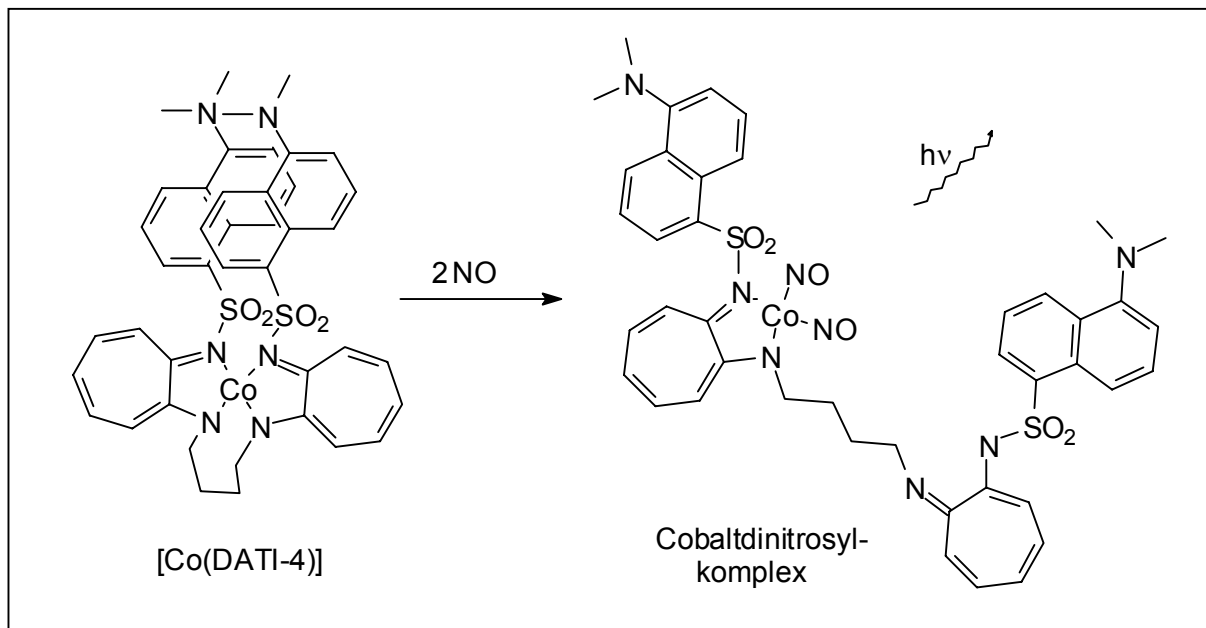


Abb. 1.8: Reaktion von [Co(DATI-4)] mit NO zu einem fluoreszierenden Cobaltdinitrosylkomplex.

Ein anderer direkter Fluoreszenznachweis für NO wurde von KATAYAMA *et. al.*<sup>[54]</sup> entwickelt. Die Methode beruht auf der Synthese eines Mimetikums für das aktive Zentrum der Guanylat-Cyclase, einem Chinolin-substituierten Cyclam-Eisen-(II)-Komplex (A). Die Fluoreszenz dieses Komplexes bei  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm wird durch Bindung von Stickstoffmonoxid an das Zentralion, Fe(II), gelöscht.

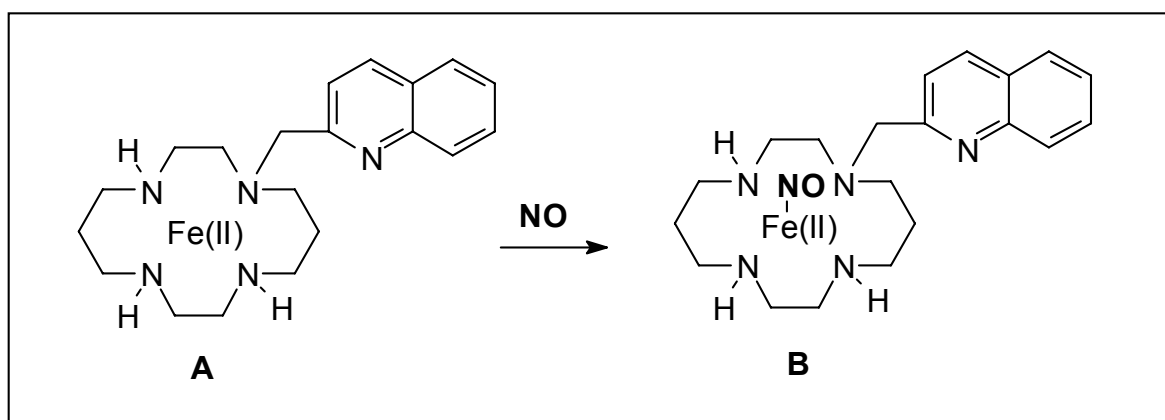


Abb. 1.9: Reaktion von NO mit dem fluoreszierenden Eisen-Komplex A zum nicht fluoreszierenden Eisen-Nitrosyl-Komplex B.<sup>[55]</sup>

Die Nachweisgrenze für NO liegt bei dieser Methode im mikromolaren Bereich. Ein weiteres System dieser Arbeitsgruppe<sup>[56]</sup> mit Nachweisgrenzen unterhalb von 100 nm basiert ebenfalls auf einem Eisenkomplex. Hier wird 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl (TEMPO) mit Acridin gekoppelt und in Puffer mit einem N-Dithiocarboxyl-sarcosin-(DTCS)-Eisen(II)-Komplex inkubiert, wodurch das Nitroxid-Radikal des nicht fluoreszierenden Acridin-TEMPO mit dem Eisen-Komplex wechselwirkt. Dies bewirkt eine Fluoreszenz des Acridin-Anteils im Molekül. Wird nun ein NO-Donator zugesetzt, wird die Fluoreszenz durch irreversible Bindung von NO an Fe(II) wieder gelöscht. Die Fluoreszenzlöschung ist dabei proportional zur NO-Freisetzung.

Die bislang beschriebenen Nachweisreagenzien für Stickstoffmonoxid sind bis auf die Metallkomplexe indirekter Natur, d. h. es werden Reaktionsprodukte von NO nachgewiesen und nicht das Molekül an sich. Die auf Metallkomplexen beruhenden Nachweismethoden erfassen direkt Stickstoffmonoxid, wobei der Nachweis um ca. eine Größenordnung unempfindlicher ist als die indirekten Methoden.

In den 90er Jahren wurden in der hiesigen Arbeitsgruppe Nachweisreagenzien für NO entwickelt, die auf o-chinoiden Systemen beruhen.<sup>[57,58]</sup> Ein substituiertes o-Chinodimethan dient dabei als Radikalfänger für das NO-Radikal (Abbildung 1.10).

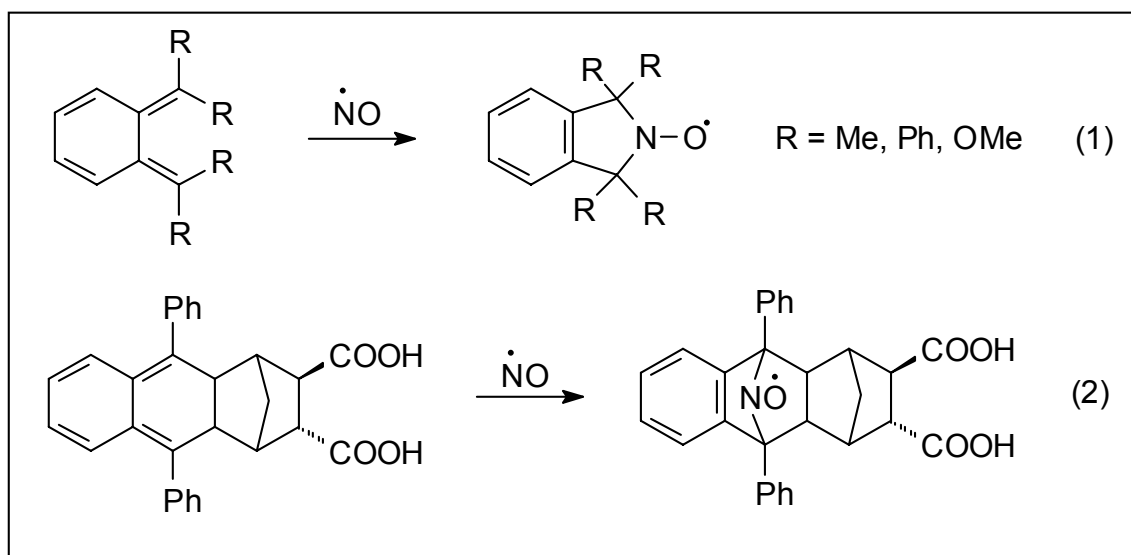


Abb. 1.10: Funktionsweise der o-Chinodimethane beim Abfang von NO. Die offenkettigen o-Chinodimethane (Reaktion 1) sind weniger stabil als die geschlossenen Formen (Reaktion 2).

Die Methode beruht auf der Möglichkeit der o-Chinodimethane, Radikale zu binden, als Nitroxid-Radikal zu stabilisieren und damit der ESR-Spektroskopie zugänglich zu machen. Die zunächst entwickelten offenen o-Chinodimethane (Abb. 1.10 (1)) zeigten nur eine geringe Stabilität, da es hier durch 1,5-Wasserstoffverschiebungen zur Bildung von Styrolderivaten kommen kann. Eine weitere unerwünschte Reaktion ist die Cyclisierung zum Benzocyclobuten. Diese Reaktionsprodukte sind nicht in der Lage, NO zu binden. Durch die Synthese cyclischer o-Chinodimethanderivate (2) konnten diese Reaktionen weitgehend ausgeschlossen werden, wodurch die Stabilität der Verbindungen erhöht werden konnte.

Diese zunächst nur für die ESR-Spektroskopie entwickelten NO-Fänger (**NOCTs**, **Nitric Oxide Cheletropic Traps**) wurden für die fluoreszenzspektroskopische Anwendung modifiziert, indem das Phenanthrengerüst als Fluorophor in das Molekül eingebaut wurde.<sup>[59,60]</sup> Diese Moleküle werden als **FNOCTs** (**Fluorescence Nitric Oxide Cheletropic Traps**) bezeichnet. Da bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht schnell Zellschädigungen bis hin zum Zelltod auftreten können, wurde das Phenanthrengerüst mit bis zu zwei Dimethylamino-Gruppen substituiert, was eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge von 310 nm nach 340-390 nm zur Folge hatte.

Um auf Einzelzellebene NO nachweisen zu können, wurden zwei Acetoxymethylester-Gruppen eingeführt, die das Molekül zellwandgängig machen. Die Funktion der FNOCTs ist in Abbildung 1.11 dargestellt. Nach dem Durchgang durch die Zellwand wird der Acetoxymethylester FNOCT/AM<sup>f</sup> durch zelleigene Esterasen gespalten. Das verbliebene Carboxylat-Dianion FNOCT/AM-DA wird in der Zelle angereichert. Wie bei den NOCTs kann NO durch Reaktion mit dem o-Chinodimethan-System als Nitroxid gebunden werden. Nach Reduktion des Radikals zu einem Hydroxylamin<sup>g</sup> beginnt die Verbindung zu fluoreszieren. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zur Menge an abgefangenem NO. Das Dianion kann die Zelle nicht mehr verlassen, da es die Zellmembran nicht durchdringen kann. Die Ausschleusung durch

---

<sup>f</sup> FNOCT/AM = 3,6-Diphenyl-4,5-(2-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(*E*)-dicarbonsäurediacetoxymethylester

<sup>g</sup> Hydroxylamin = 3,5-Diphenyl-3,5-(2-dimethylamino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-aza-4-hydroxy-8,9-(*E*)-dicarbonsäurediacetoxymethylester

unspezifische Anionenkanäle kann durch bestimmte Hemmstoffe, wie z. B. Probenecid, unterbunden werden.

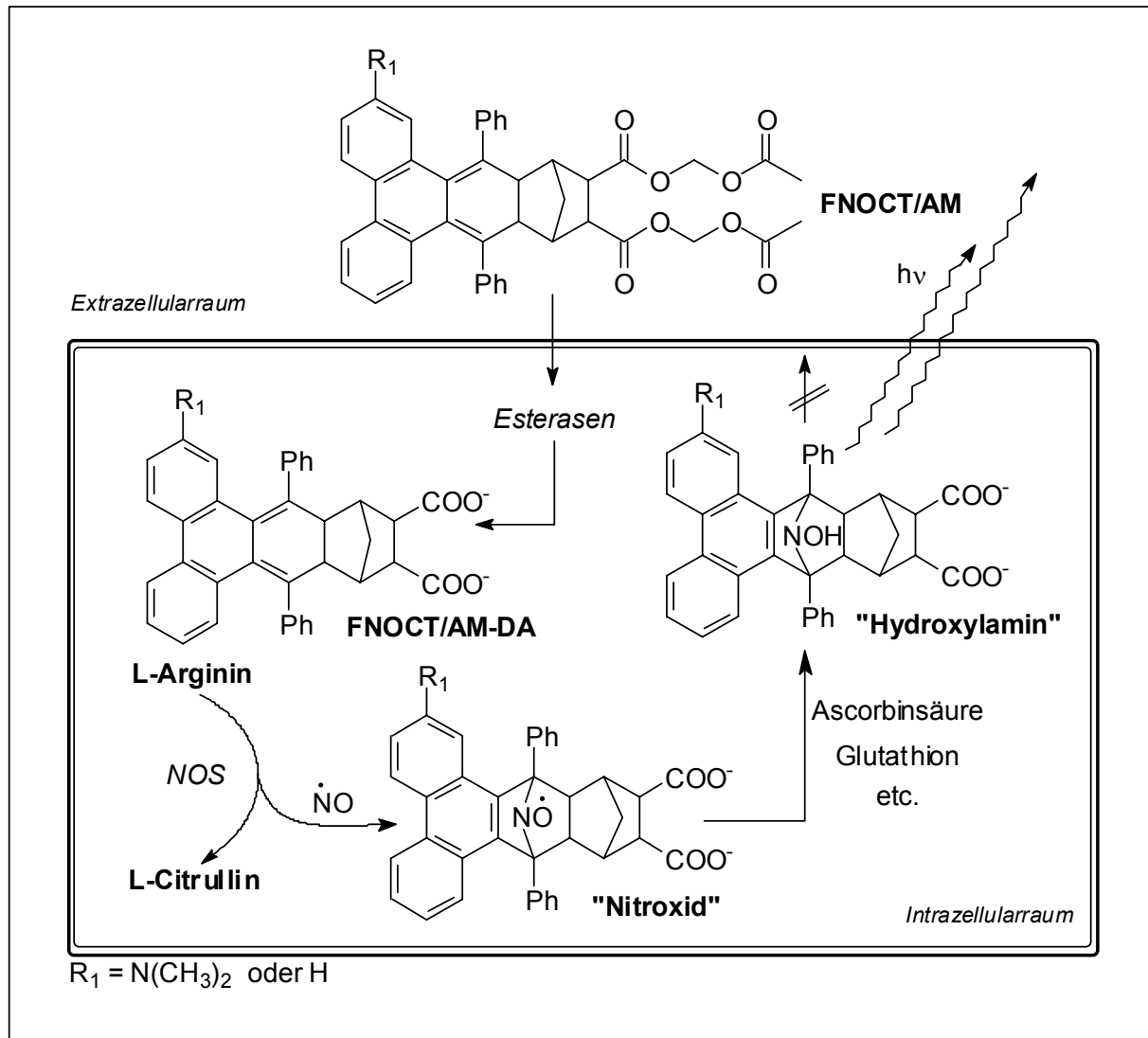


Abb. 1.11: Durchgang von **FNOCT/AM** durch die Zellwand, Esterspaltung zum Dianion **FNOCT/AM-DA** und Reaktion mit  $\text{NO}$  zu einem „**Nitroxid**“. Reduktion durch z.B. Ascorbinsäure oder Glutathion liefert ein „**Hydroxylamin**“, welches fluoresziert.

Für Zellüberstandsmessungen, aber auch für Untersuchungen im chemischen System kann die freie Säure (FNOCT) eingesetzt werden, deren Synthese weniger aufwändig ist. Zu den chemischen Einsatzgebieten zählen z.B. Untersuchungen von  $\text{NO}$ -Lösungen oder  $\text{NO}$ -Donatoren.



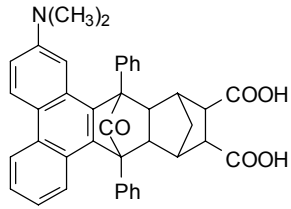
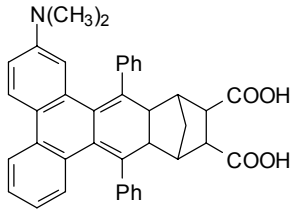
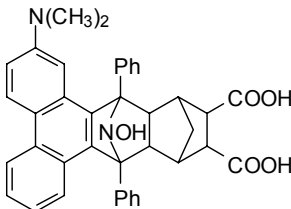
Beide Substanzen, FNOCT und FNOCT/AM wurden an einigen Zelltypen hinsichtlich ihrer Toxizität getestet. Sie erwiesen sich in den für biologische Messungen relevanten Konzentrationen von ca. 50  $\mu\text{M}$  als nicht toxisch.

Weitere Untersuchungen befassen sich mit der Wirkung des FNOCTs auf die Aktivität der NO-Synthase<sup>[61]</sup>. Hier wurde in Anwesenheit von Proteinen keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität von eNOS und iNOS beobachtet.

Sehr interessante Versuche konnten im Hinblick auf die endogene NO-Bildung in einzelnen Zelltypen mit Hilfe des FNOCT-Farbstoffes durchgeführt werden<sup>[60]</sup>. Hier stand vor allem die Fluoreszenzmikroskopie im Mittelpunkt, da die Bildung von NO nach Stimulierung der Zellen (z.B. durch Zusatz von LPS bei Makrophagen oder durch Calcium-Gaben bei Endothelzellen oder PC12-Zellen) in situ durch Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Für diese Experimente wird FNOCT/AM eingesetzt.

Das FNOCT-System wurde hinsichtlich seiner Eigenschaften im chemischen System untersucht.<sup>[20,63]</sup>

Die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften des Dimethylamino-substituierten FNOCT, seiner Vorstufe (Keton) und des Reduktionsproduktes nach Reaktion mit NO (Hydroxylamin) sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Verbindung	Lösungsmittel	$\lambda_{\text{exc}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]
 Keton	Phosphatpuffer pH = 7.2  Tetrahydrofuran	380  380	460  460
 FNOCT	Phosphatpuffer pH = 7.2	460	600
 Hydroxylamin	Phosphatpuffer pH = 7.2	380	460

Hinsichtlich der Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$  des Ketons bzw. des Hydroxylamins ist zu beachten, dass dies nicht dem Maximum der Absorptionsbande entspricht, sondern der Absorption des substituierten Phenanthrengerüstes. Die maximale Absorptionsbande befindet sich beim Hydroxylamin in Phosphatpuffer  $> 320 \text{ nm}^{\text{h}}$  mit einer Schulter bei  $340 \text{ nm}$ , beim Keton bei  $340 \text{ nm}$  in Tetrahydrofuran ( $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge). Bei ca.  $380\text{-}395 \text{ nm}$  findet man die längstwellige Absorptionsbande des Phenanthrens ( $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang, schwach).<sup>[64]</sup> Die kurzwelligen,

<sup>h</sup> Dies ist vom jeweiligen Fluorimeter abhängig, wie in Kapitel 5 gezeigt wird.

intensiveren Banden sind auf die höherenergetischen Übergänge des Phenanthrens ( $S_0 \rightarrow S_2$  und  $S_0 \rightarrow S_3$ )<sup>[64]</sup> sowie auf die weiteren im Molekül befindlichen Phenylgruppen zurückzuführen. Da sie aber anscheinend mit dem Phenanthren-gerüst bei Anregung in Wechselwirkung stehen, steigt bei dessen Bildung nicht nur die Fluoreszenz und damit die Intensität der Absorptionsbande bei 380 nm an, sondern in gleichem Maße die der kürzerwelligen Banden. Bei den in der Literatur<sup>[20,60,61]</sup> angegebenen Anregungsspektren wurden die kurzwelligen Banden nicht gezeigt, um die Korrespondenz zwischen der langwelligen Anregung und den Emissionsspektren besser zu verdeutlichen. Für kinetische Untersuchungen empfiehlt sich aber wegen der höheren Intensität die Messung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320$  nm.

Die Aromatenbanden wirken sich auch auf das o-Chinodimethansystem (FNOCT) aus, so dass auch hier das Anregungsspektrum aus oben genannten Gründen ohne den kurzwelligen Anteil in der angegebenen Literatur gezeigt wurde. Hier findet man die maximale Absorption bei  $\lambda_{\text{exc}} = 475$  nm, die Aromatenabsorption tritt als etwas weniger intensive Bande bei  $\sim \lambda_{\text{exc}} = 320$  nm auf. Die Fluoreszenzbande beobachtet man bei  $\lambda_{\text{em}} = 580 - 600$  nm.

Weitere Untersuchungen bezogen sich insbesondere auf die Selektivität des NO-Nachweises. Es zeigte sich, dass das o-chinoide System nicht mit anderen reaktiven Sauerstoffspezies wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder dem Superoxidradikalanion reagierte. Mit OH-Radikalen beobachtete man einen geringfügig schnelleren Anstieg der Fluoreszenz. Lediglich die Zugabe von Peroxynitrit führte zur Bildung des Fluorophors. Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration des Fluorophors wurde eine lineare Abhängigkeit vom nanomolaren Bereich bis hin zu 100  $\mu\text{M}$  des Fängers gefunden. Die Detektionsgrenze im wässrigen System lag für das FNOCT-System bei 2.5 nM NO.

Die Fluoreszenz des unsubstituierten FNOCT und des zugehörigen Hydroxylamins ist nicht vom pH-Wert der Messlösung abhängig. Für die Dimethylamino-substituierten Systeme, die protoniert werden können, wurde eine pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz sowohl für FNOCT als auch für das entsprechende Hydroxylamin gefunden.

Aus den beschriebenen Untersuchungen geht hervor, dass das FNOCT-System gut für den Nachweis von Stickstoffmonoxid geeignet ist. Über Anwendungen in biologischen Systemen wurde berichtet.<sup>[62]</sup> Weitere Anwendungen des Detektionssystems könnten in chemischen Systemen zu finden sein. Im Bereich der NO-freisetzenden Substanzen, z. B. der NONOate, wird sehr intensiv geforscht. Daher bestehen z. B. im Bereich kinetischer Messungen des Zerfalls dieser Substanzen unter NO-Freisetzung sicherlich Anwendungsmöglichkeiten, da mit dem FNOCT-System direkt die NO-Bildung beobachtet werden kann.

## 2 Zielsetzung

Mit dem von P. MEINEKE synthetisierten o-chinoiden Fluoreszenzmarker FNOCT wurde in der Vergangenheit eine sowohl im chemischen als auch im biologischen System gut anwendbare Nachweismethode für Stickstoffmonoxid entwickelt. Die Anwendung im biologischen System sowie die Bestimmung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften standen in der Arbeit von P. MEINEKE im Vordergrund. Probleme tauchten bei der Darstellung dieser Verbindung auf, da bei dem 7-stufigen Syntheseweg einige Reaktionsschritte nur geringe Ausbeuten lieferten. Ein weit grösseres Problem stellten allerdings die teilweise sehr geringen Mengen von wenigen Milligramm, in denen die Verbindungen erhalten wurden, dar. Dabei spielte weniger eine mangelnde Ausbeute als vielmehr die generelle Methode der Herstellung vor allem bei den Synthesestufen 3-7 eine Rolle, die keine grösseren Ansätze erlaubte.

Um dieses gut funktionierende Testsystem in grösseren Mengen verfügbar zu machen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine Optimierung der Synthese des FNOCT-Moleküls erfolgen. Ziel war es, vor allem die Mengen der einzelnen Vorstufen durch Modifikation des Syntheseweges zu steigern und damit hinreichende Mengen an Depotverbindungen für die letzte Stufe, die den weniger stabilen Fluoreszenzfarbstoff liefert, zur Verfügung zu haben.

Eine weitere Aufgabe war die weitergehende Bestimmung der physikalischen, chemischen und physiologischen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen. Da der Farbstoff bislang insbesondere in chemischen Systemen nur wenig erprobt wurde, sollte auch hier seine Anwendbarkeit optimiert werden. So sollten Vorschriften erstellt werden, die es biologisch und physiologisch-chemisch interessierten Anwendern erlaubt, das FNOCT-System in einfacher Weise erfolgreich anzuwenden.

Da bislang gute Ergebnisse in biologischen Systemen mit dem Fluoreszenzmarker gewonnen werden konnten, sollte versucht werden, weitere Derivate der Verbindung zu synthetisieren. Dabei sollte vor allem das Fluorophor hinsichtlich seiner Anregungswellenlängen modifiziert werden. Sinnvoll ist eine weitere bathochrome

Verschiebung, da dann noch weniger Zellschädigung bei der Fluoreszenzmikroskopie zu erwarten ist, als es bei bisherigen FNOCT-Systemen der Fall ist. Dies könnte durch Verwendung anderer Fluorophore als Phenanthren erreicht werden. Dies könnten z. B. Triphenylen oder Pyren sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Veränderung der Position des Dimethylamino-Substituenten am Phenanthrengerüst. Auch hiermit könnte eine Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften einher gehen.

Zur Überprüfung der erstellten Anwendungsvorschriften sollten physikalisch-chemische Untersuchungen an chemischen Stickstoffmonoxid-Donatoren, zu denen z. B. die Diazeniumdiolate (auch als NONOate bezeichnet) gehören, durchgeführt werden. Hier sollten z. B. die kommerziell zugänglichen Substanzen MAHMA/NO, PAPA/NO und Spermin/NO verwendet werden. Bislang wurde der Zerfall der Diazeniumdiolate meist durch Beobachtung der Bildung der organischen Produkte nach Abspaltung von NO, bevorzugt mittels UV/Vis-Spektroskopie, beobachtet. Experimente zur Beobachtung des Zerfalls dieser Verbindungen in einer Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes FNOCT sollten Aufschluss über den Verbleib des Stickstoffmonoxids bei unterschiedlichen Bedingungen geben. Schwerpunkte hierbei sollten neben der Untersuchung der Kinetik des Zerfalls der Diazeniumdiolate die Betrachtung der Reaktivität des freigesetzten Stickstoffmonoxids gegenüber Sauerstoff und Superoxid sowie das Verhalten gegenüber verschiedenen Reduktionsmitteln sein.

### 3 Optimierung der FNOCT-Synthese

Zunächst wurde Phenanthren-9,10-chinon (**1**) mit Salpetersäure nitriert; die Ausbeute an 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**) betrug 60 %. Dabei konnten bei Einsatzmengen von 30.0 g Produktmengen von 25.2 g erhalten werden. Die anschließende Reduktion zum 2-Aminophenanthren-9,10-chinon (**3**) erfolgte mittels Natriumdithionit in basischer wässriger Lösung und lieferte eine Ausbeute von 72 %. Hier lieferten 5.00 g des Eduktes **2** 3.20 g an **3**. Mit Dimethylsulfat konnten 57 % N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon (**4**) gewonnen werden. Die eingesetzten Mengen lagen bei 1.25 g und lieferten 0.80 g an **4**. Durch eine Aldolkondensation wurden hieraus bei einer Eduktmenge von 0.55 g in 45 %iger Ausbeute 0.43 g N,N-Dimethyl-2-aminophencyclon (**5**) synthetisiert. Die folgende Diels-Alder-Reaktion mit Norbornendicarbonsäure bzw. Norbornendicarbonsäurediacetoxymethylester führte zu Ausbeuten von 72 % (103 mg) Säure-Addukt **6** aus 100 mg an **5**, bzw. 85 % (150 mg) Ester-Addukt **6e** aus ebenfalls 100 mg an **5**. Die anschließende Photodecarbonylierung lieferte in quantitativer Ausbeute nach 68 bzw. 78 stündiger Reaktion bis zu 100 mg FNOCT **7** bzw. FNOCT/AM **7e**. Die Gesamtausbeute der Reaktionen betrug 9 % für FNOCT **7**, bzw. 8 % für FNOCT/AM **7e**.<sup>[63]</sup>

Die Zielmoleküle können auf die beschriebene Weise zwar in guten bis akzeptablen Ausbeuten, aber nur in geringen absoluten Mengen hergestellt werden. Dies ist bedingt durch die verwendeten Vorschriften, die ein einfaches „upscaling“ der Einsatzmengen nicht zulassen. So sollten die einzelnen Reaktionsschritte durch Variation der existierenden Vorschriften hinsichtlich der Ausbeuten, aber vor allem der verfügbaren Mengen optimiert werden. Die gesamte Synthese ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten wurden auf dem Reaktionspfeil, die Literaturausbeuten<sup>[63]</sup> in Klammern darunter aufgeführt.

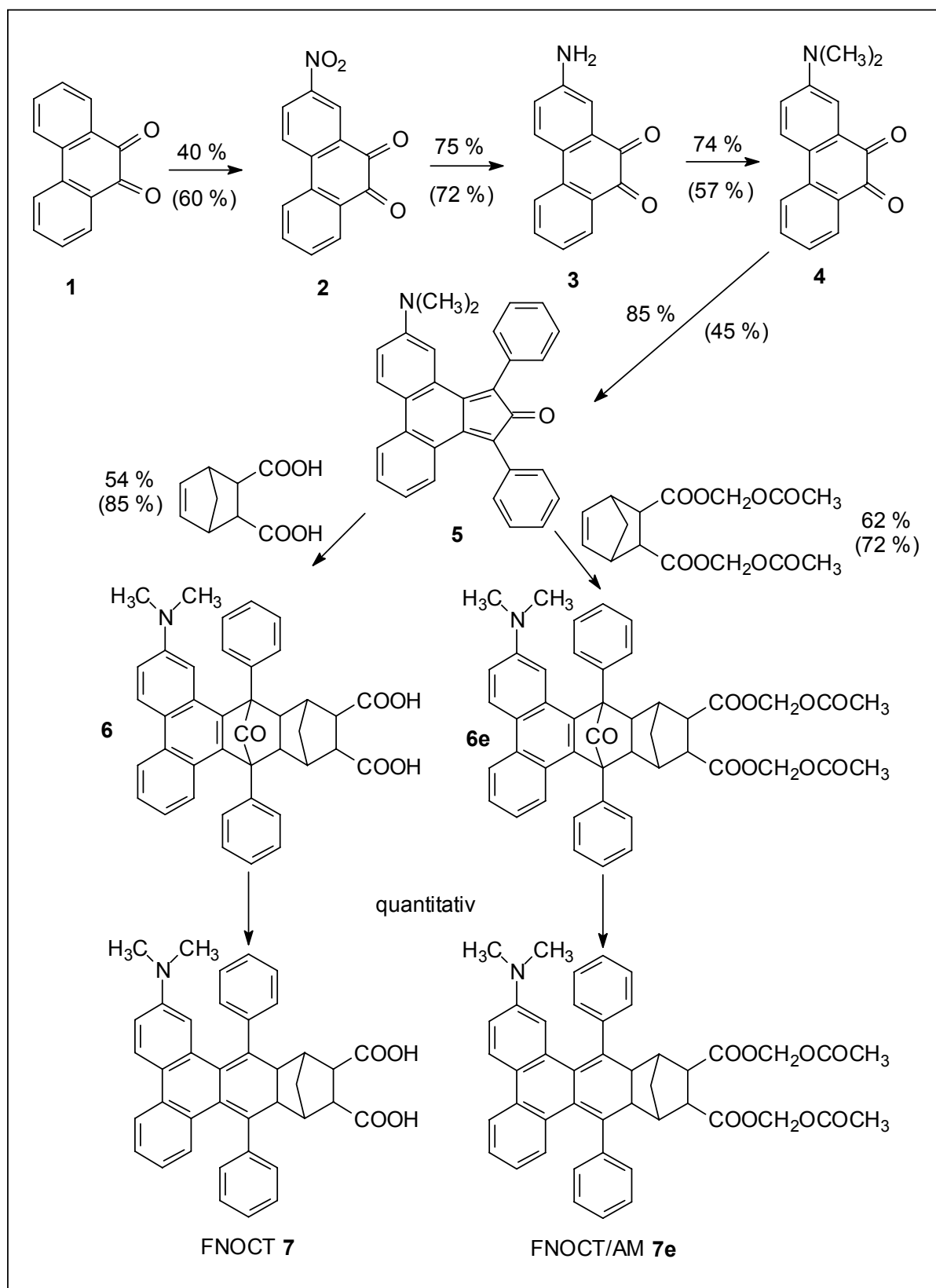


Abb. 3.1: Reaktionsschema der FNOCT- und FNOCT/AM- Synthese mit optimierten Ausbeuten im Vergleich mit Literaturausbeuten (in Klammern).



Zunächst wurden die Reaktionen, die zur Dimethylamino-Substitution der Zielverbindungen **7** und **7e** führten, optimiert, um für die nachfolgenden Reaktionen genügend Eduktmaterial zur Verfügung zu stellen. Limitierend für die Gesamtreaktion ist die Umsetzung des substituierten Phenanthren-9,10-chinons **4** mit 1,3-Diphenyl-2-propanon. Hier bestand umfangreicher Arbeitsbedarf, um grössere Mengen herstellen zu können. Die anschliessende Diels-Alder-Reaktion mit Norbornendicarbonsäure ist durch den hohen Lösungsmittelverbrauch bei der Reinigung ebenfalls zur Synthese grösserer Mengen nicht geeignet. Die Photolysereaktion konnte aus technischen Gründen (Limitierung durch die Grösse des zur Verfügung stehenden Photoreaktors) bislang nicht in grösserem Massstab durchgeführt werden.

### 3.1 Substitution

Die **Nitrierung** von Phenanthren-9,10-chinon (**1**) mit 65 %iger Salpetersäure lieferte neben dem gewünschten 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**) noch eine weitere Verbindung, die als 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon identifiziert wurde.<sup>[65]</sup> Beide Verbindungen fielen etwa im Verhältnis 1:1 an, wenn man während der Reaktion Argon durch die Reaktionsmischung leitete, um nitrose Gase zu entfernen. Es wurde herausgefunden, dass die Derivate durch Erhitzen des Rohproduktes mit Ethanol sauber von einander getrennt werden konnten, da sich 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon in Ethanol vollständig löste, 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon jedoch nicht. Die Gesamtausbeute der Reaktion betrug ca. 80 % wovon 41 % auf 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon und 42 % auf 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon entfielen. Die Ansatzgrösse betrug 30 g und lieferte 13.9 g 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon. Dieses wurde nach Umkristallisation in 100 %iger Essigsäure weiter zum 2-Aminophenanthren-9,10-chinon (**3**) umgesetzt. 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon wurde ebenfalls aufgearbeitet. Diese Verbindung wird in Kapitel 4 ausführlich behandelt.

Die **Reduktion** von 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon mit Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) lieferte 2-Aminophenanthren-9,10-chinon<sup>[66]</sup> (**3**) in 75 %iger Ausbeute. Die existierende Synthese-Vorschrift wurde nicht wesentlich verändert. Es wurde aber 2 M Natronlauge eingesetzt, anstatt die Base in einer Konzentration von 1.5 M zu verwenden. Diese Veränderung wurde vorgenommen, da das Edukt häufig noch

Reste von Essigsäure aus der Umkristallisation enthält, die nur durch sehr lange Trocknungszeiten (mehrere Tage im Ölpumpenvakuum) zu entfernen sind. Durch die Essigsäurereste liegt der pH-Wert der Reaktionslösung nicht mehr bei 14. Dies hat eine unvollständige Umsetzung des Eduktes und somit Ausbeuteverluste und Verunreinigungen zur Folge, was eine Umkristallisation unerlässlich macht. Durch die Erhöhung der Basen-Konzentration konnte dieses Problem behoben werden. Das Produkt 2-Aminophenanthren-9,10-chinon fiel trotz des Einsatzes noch leicht essigsäurehaltigen Eduktes in sehr hoher Reinheit an. Die Umkristallisation, die sehr hohe Ausbeuteverluste und einen hohen Arbeitsaufwand mit sich bringt, da das Produkt nur mässig in Ethanol löslich ist, konnte somit entfallen. Die Ansatzgröße konnte von 5.00 g auf 12.5 g angehoben werden und lieferte 8.35 g anstatt ca. 3 g des Produktes.

Bei der **Methylierungsreaktion** zum N,N-Dimethyl-2-amino-phenanthren-9,10-chinon **4** wurde das komplette Syntheseverfahren umgestellt. Nach einer Vorschrift, die auch von P. MEINEKE bereits zur Darstellung eines disubstituierten FNOCT-Abkömmlings verwendet wurde,<sup>[66]</sup> konnte die aufwendige Umsetzung mit dem sehr giftigen Dimethylsulfat durch eine Reaktion ersetzt werden, die analog der Leukart-Wallach-Reaktion zur Methylierung von Aminen abläuft.<sup>[67]</sup> Im Unterschied zur Leukart-Wallach-Reaktion verläuft die Übertragung eines Hydrid-Ions auf das Amin nicht mit Hilfe von Ameisensäure sondern unter Einsatz von Natriumborhydrid. Vorteile dieser Reaktionsvariante sind neben einer Steigerung der Ausbeute von 57 % auf 74 % vor allem die vollständige Umsetzung zum N,N-Dimethyl-2-amino-phenanthren-9,10-chinon. Bei der Methylierung mit Dimethylsulfat tritt als Verunreinigung des gewünschten Produktes neben nicht umgesetztem Edukt immer auch eine nicht zu vernachlässigende Menge an N-Methyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon, dem monomethylierten Zwischenprodukt, auf. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die lange Reaktionszeit (ca. ein Tag) und die erforderliche Probennahme im Abstand von 30 min, um die Umsetzung dünnschichtchromatographisch zu verfolgen. Die Reaktion kann nach dem neuen Syntheseverfahren bequem in einer Stunde durchgeführt werden. Nach Isolierung von N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon kann eine aufwändige chromatographische Trennung entfallen. Hier ist eine Reinigung über eine kurze Kieselgel-Säule mit einem Lösungsmittelgemisch aus Toluol und Ethylacetat (3:1) als Laufmittel

ausreichend, auf welcher restliche Verunreinigungen, z. B. bei der Reaktion gebildetes Paraformaldehyd, zurückbleiben. Eine Umkristallisation in Ethanol als Reinigungsmethode ist zwar möglich, die anfallenden Kristalle sind jedoch nur sehr schwer wieder in Ethanol, dem Lösungsmittel der Folgestufe löslich, was einen erhöhten Lösungsmittelbedarf und Arbeitsaufwand zur Folge hat.

Durch die Verfahrensumstellung und die damit verbundene Möglichkeit der Vergrößerung des Ansatzes um etwa das 8-fache konnte die erhaltene Menge an Reaktionsprodukt von 0.80 g auf 6.70 g gesteigert werden.

## 3.2 Aldolkondensation und Diels-Alder-Reaktion

Die **Kondensation** von **4** mit Diphenyl-2-propanon zu N,N-Dimethyl-2-aminophencyclon unter Einsatz von Kaliumhydroxid als Base war bislang auf die maximale Menge von 400 mg begrenzt, da bei größeren Ansätzen die gleichmäßige Erwärmung des Reaktionsgemisches auf 55°C nicht mehr gewährleistet war. Ausserdem zersetzte sich das gebildete Cyclon relativ schnell zu unreaktiven Produkten. Als Lösung für diese Probleme stellte sich nach diversen Versuchen eine Veränderung der Reihenfolge der Zugabe der Edukte heraus. In der beschriebenen Vorschrift<sup>[68]</sup> wurden alle Edukte vermischt, auf 55°C erwärmt, um dann mit der kompletten Menge an ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung versetzt zu werden. Die aus Kaliumhydroxid entstehenden OH<sup>-</sup>-Ionen greifen zunächst die aciden Wasserstoffatome des 1,3-Diphenyl-2-propanon an und bilden ein Enolat-Ion, welches in der Lage ist, an den Carbonylkohlenstoffatomen des Phenanthrenchinons anzugreifen, was zur Ausbildung von C-C-Bindungen und damit zu einem Ringschluß führt. Gab man die ethanolische KOH komplett zu, traten anscheinend durch die hohe Basizität der Reaktionslösung und die Möglichkeit des Angriffs der Hydroxid-Ionen auch an die Carbonylkohlenstoffatome des Phenanthrenchinons vermehrt Nebenreaktionen auf. Gab man dagegen zunächst die Hälfte der benötigten Kaliumhydroxid-Lösung zum Propanon und tropfte die Lösung mit den darin gebildeten „Propanylanionen“ (erkennbar an der gelben Farbe; die Lösung des reinen Propanons ist farblos) zur Lösung des substituierten Phenanthrenchinons **4**, bildet sich zunächst eine offenkettige Verbindung durch Angriff des 1,3-Diphenyl-2-propylylanions an eine Carbonylgruppe von **4**. Nach Zugabe der anderen Hälfte der

Kaliumhydroxid-Lösung zum Reaktionsgemisch erfolgte der Ringschluß und es entstand das Cyclon **5** (Abbildung 3.2). Die Reaktion konnte auf diese Weise kontrollierter durchgeführt werden, was zu einer besseren Temperaturkonstanz im Reaktionsgemisch führte. Damit ging auch eine bessere Löslichkeit des Eduktes einher.

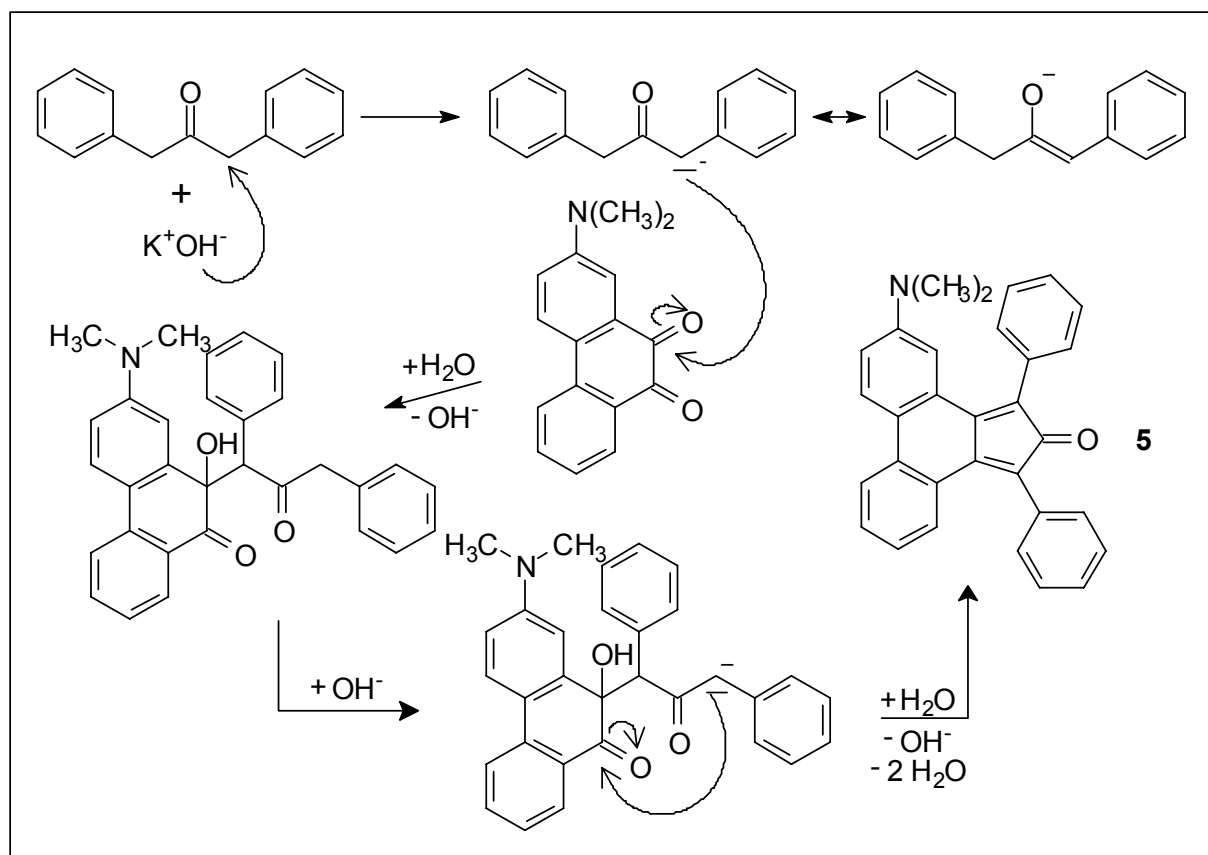


Abb. 3.2: Mechanismus der Aldolkondensation von 1,3-Diphenyl-2-propanon mit  $N,N$ -Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon zum Cyclon **5**. Das „Propenylanion“ wird zunächst gebildet und der Phenanthrenchinon-Lösung zugesetzt. Erst nach Zugabe weiterer  $\text{KOH}$ -Lösung erfolgt der Ringschluss.

Die Ausbeuten konnten von 45 % auf 85 % gesteigert werden. Diese Ausbeuten wurden erreicht, wenn man die Reaktion unter Schutzgas in einer trockenen Apparatur durchführte, da Wasser ein Produkt der Kondensation ist und die Gleichgewichtsreaktion auf die Eduktseite verschieben kann. Die Menge an Produkt konnte von 400 mg auf fast 7 g gesteigert werden. Größere Ansätze sind

wahrscheinlich möglich, sofern man Temperaturkonstanz und den Ausschluß von Wasser gewährleistet.

Mit Norbornendicarbonsäure oder deren Diacetoxymethylester bildet sich aus dem Phencyclon **5** ein **Diels-Alder-Addukt** (Säure **6** oder Ester **6e**). Bislang konnten diese Verbindungen nur in Mengen um 100 mg dargestellt werden. Dies war vor allem auf die geringe Verfügbarkeit des Eduktes zurückzuführen. Eine Verbesserung der Methode im Gegensatz zum bekannten Verfahren wurde bei der Diels-Alder-Reaktion vorgenommen. Das Edukt, N,N-Dimethyl-2-aminophencyclon (**5**) zersetzt sich unter den gewählten Bedingungen mit der Zeit und steht so nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung. Um die Norbornendicarbonsäure komplett zu verbrauchen, wurde das Phencyclon **5** im Überschuß von 15 % zugegeben, da es selbst und seine Zersetzungsprodukte in Heptan leicht löslich waren und bei der Reinigung abgetrennt werden konnten. Norbornendicarbonsäure dagegen war in Heptan schwer löslich und fiel mit dem Reaktionsprodukt aus, was die anschließende Reinigung erschwerte. Die Reaktion mit dem Diacetoxymethylester der Norbornendicarbonsäure verlief im Prinzip ähnlich, jedoch wurde die Reaktion anstatt in Chlorbenzol bei 130°C in Toluol bei 111°C durchgeführt.

Die bisher durchgeführte Aufarbeitung benötigte große Lösungsmittelmengen. Hier war das Problem der Ansatzvergrößerung zu lösen. Das Rohprodukt wies starke Verunreinigungen auf, die bislang durch mehrfaches Lösen in Tetrahydrofuran und anschließende Fällung in Heptan entfernt wurden. So mussten für die grösseren erhaltenen Produktmengen der Diels-Alder-Reaktion andere Wege zur Aufarbeitung gefunden werden. Dabei erwies sich eine Fest-Flüssig-Extraktion mit Toluol als effektivste Methode, um die Verunreinigungen grösstenteils zu entfernen. Für die weitere Reinigung kam das ursprüngliche Verfahren in modifizierter Form zum Einsatz. Zunächst musste der Feststoff in Tetrahydrofuran gelöst werden, obwohl er darin nur sehr schwer löslich war. Hatte man ihn jedoch einmal gelöst, konnte das Lösungsmittel zu einem großen Teil wieder abgezogen werden, ohne daß das Produkt ausfiel. Die Einengung war notwendig, weil das Produkt aus Tetrahydrofuran mit der 10 fachen Menge an n-Heptan gefällt werden sollte. Dieses Verhältnis der Lösungsmittel n-Heptan und Tetrahydrofuran ist optimal für die quantitative Ausfällung des Produktes geeignet. Somit musste die Menge an Tetrahydrofuran so gering wie möglich gehalten werden. Nach Filtration und Trocknung des Produktes

war die Substanz leicht in Tetra-hydrofuran löslich, was möglicherweise auf eine Komplexbildung mit dem Lösungsmittel zurückzuführen ist. Dies wird auch durch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum in deuteriertem Tetrahydrofuran bestätigt, in welchem auch nach langer Trocknung des Produktes im Ölpumpenvakuum noch undeutertes Tetrahydrofuran neben den deuterierten Anteilen gefunden wurde. Wenn die Tetrahydrofuran-Lösungen gelblich-braun waren, konnten letzte Verunreinigungen durch Zusatz von Aktivkohle entfernt werden. Die Verbindungen konnten bis auf Reste des Lösungsmittels rein dargestellt werden.

Man erhielt bei Reaktion mit Norbornendicarbonsäure Ausbeuten von ca. 50 % an Verbindung **6** und bei Reaktion mit dem Ester 60 % an Verbindung **6e**. Die Mengen konnten von 100 mg auf 3.00 g gesteigert werden.

### 3.3 Photolyse

Für den letzten Schritt der Synthese der FNOCT-Verbindungen **7** und **7e** wurde ein photochemisches Verfahren, die Decarbonylierung der Ketone **6** bzw. **6e** bei Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300 \text{ nm}$  angewendet. Die Reaktion wurde bislang unter Verwendung hoher Konzentrationen des Eduktes in einem Quarz-Rohr durchgeführt. Da die Reaktionszeit sowohl von der Konzentration als auch von der Schichtdicke abhängig ist, mußten sehr lange Reaktionszeiten in Kauf genommen werden (zum Teil bis zu 80 Stunden). Aus diesem Grunde sollte auch hier eine Optimierung durchgeführt werden.

Ein Ansatz hierfür war die Entwicklung einer speziellen Apparatur aus Quarzglas für die Photolyse (Abbildung 3.3), in welcher die Reaktion unter Ausschluß von Luft und Feuchtigkeit durchgeführt werden kann.

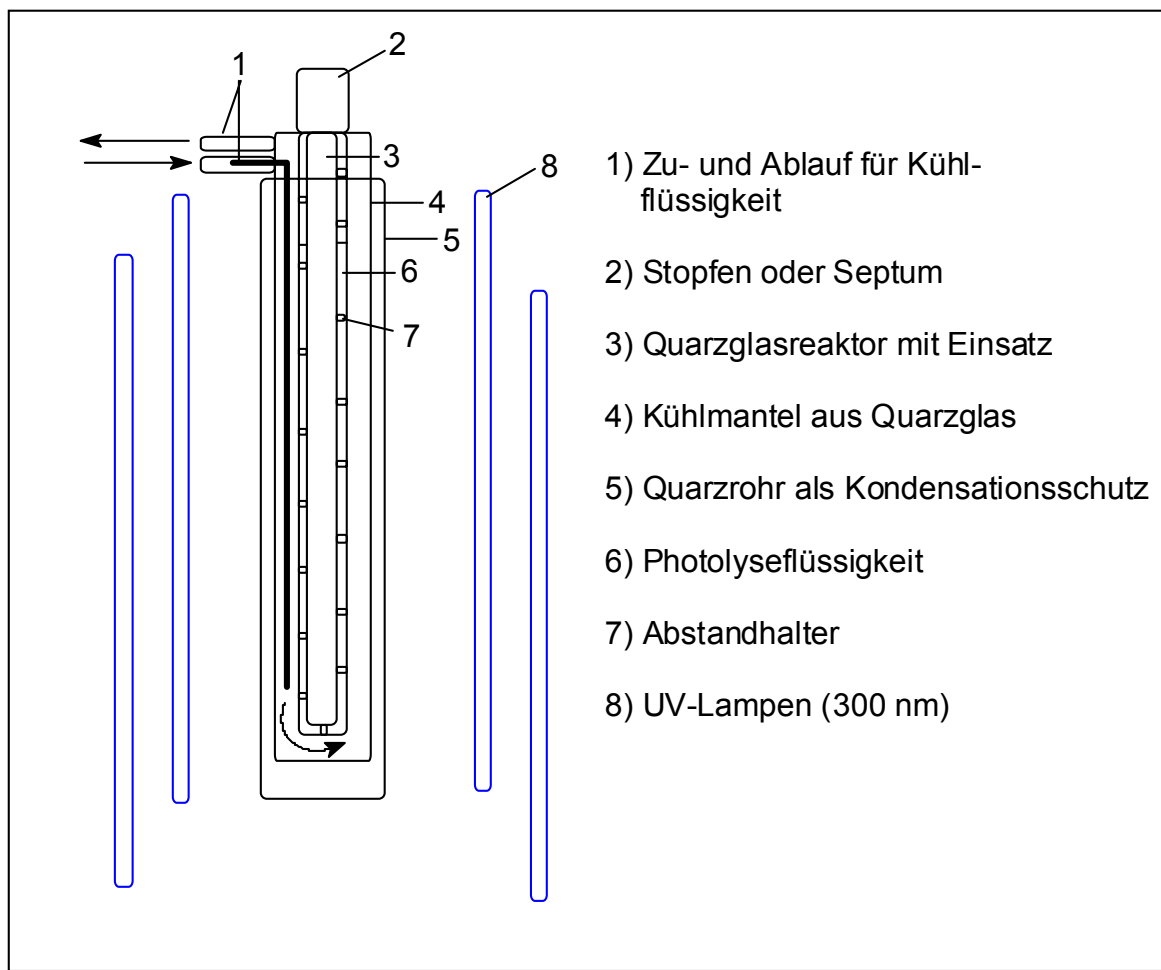


Abb. 3.3: Photolyseapparatur zur Darstellung von FNOCT und FNOCT/AM

Der Gefäßdurchmesser und damit die Schichtdicke der Reaktionslösung wurde verringert, indem die Apparatur mit einem Einsatz versehen wurde, der eine Schichtdicke von 0.2 cm vorgibt. Andererseits wurde die Konzentration der Lösung soweit herabgesetzt, bis die Reaktionszeit nur noch 18-20 h betrug. Zwar konnten pro Ansatz nur 50 mg bis zu einer Reinheit von 95 % umgesetzt werden, aber man konnte in den 80 Stunden, die die Reaktion zuvor beanspruchte mindestens drei Ansätze fahren, was schliesslich mehr Produkt lieferte, als ein sehr konzentrierter Ansatz, bei dem 100 mg die größtmögliche Einsatzmenge war. Neben nicht umgesetztem Edukt traten bei langer Bestrahlung mit UV-Licht auch immer Verunreinigungen durch Folgeprodukte auf, die bei kürzeren Bestrahlungszeiten minimiert werden können. Der Einsatz von Schutzgas (Argon), das bisher kontinuierlich durch die Reaktionslösung geleitet wurde, konnte entfallen, weil das Edukt fortwährend im geschlossenen Gefäß unter Argon gehalten wurde. Hierzu

wurde das Photolyserohr mit dem Edukt als Feststoff in ein dafür konstruiertes Schlenk-Gefäss eingebracht, evakuiert und mehrfach mit Argon belüftet. Anschliessend wurde unter Schutzgas trockenes, mit Argon gespültes Tetrahydrofuran zugesetzt, das Photolyserohr verschlossen und in einen im Photoreaktor befindlichen Kühlmantel eingebracht. Die Aufarbeitung musste abgeändert werden, da grössere Mengen des Lösungsmittels (30 mL) nicht an der Ölpumpe abgezogen werden konnten, wie es bei der Durchführung im NMR-Röhrchen möglich war. So wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bei geringer Temperatur (15-20°C) auf ca. 1-2 mL eingengt und dann in ein kleines Schlenk-Gefäss überführt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Wichtig ist eine schnelle Entfernung des Lösungsmittels, da Versuche ergaben, dass sich das FNOCT-Molekül in Tetrahydrofuran innerhalb eines Tages bei Raumtemperatur zersetzt. Liegt die Substanz als trockenes Pulver vor, konnte sie gekühlt (bei -78°C) und unter Argon mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Eine weitere Vergrösserung des Ansatzes ist nicht ohne technische Veränderung des Verfahrens möglich. Hat man jedoch grosse Mengen des Eduktes zur Verfügung, könnte sich die Anwendung eines Fallfilm-Photolysereaktors als gute Möglichkeit zur Synthese von FNOCT erweisen. Da für die Verwendung des zur Verfügung stehenden Fallfilm-Photoreaktors jedoch umfangreiche Modifizierungen der Lichtquelle notwendig gewesen wären, wurde im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet.

### 3.4 Zusammenfassung

Die Modifikationen an der FNOCT-Synthese waren vor allem auf eine Steigerung der Produktmengen ausgelegt. Abgesehen von der Nitrierungsreaktion, die zwei unterschiedliche Produkte lieferte, die zuvor nicht getrennt worden waren, wurden die Mengen der synthetisierten Substanzen ab der 2. Stufe jeweils gesteigert. So lieferte die optimierte Reduktionsreaktion 8.35 g an Verbindung **3** anstatt 3.20 g, was einer Steigerung um das dreifache bei einer gleichbleibend guten Ausbeute von 75 % entspricht. Zuvor wurden 72 % Ausbeute erzielt. Bei der Methylierungsreaktion wurde die Menge an Produkt um das 8 fache von 0.80 g auf 6.70 g bei einer



Steigerung der Ausbeute von zuvor 57 % auf 75 % erhöht. Eine etwa 18 fache Produktsteigerung wurde bei der modifizierten Aldolkondensation erreicht. So wurden die Mengen an **5** von 0.40 g auf 7.00 g angehoben. Die Ausbeuten konnten von 45 % auf 85 % gesteigert werden. Bei der anschliessenden Diels-Alder-Reaktion wurden Ansatzgrösse und Produktmenge auf das 20-30 fache der bislang zugänglichen Menge erhöht. Für Säure **6** und Ester **6e** wurden Produktmengen um 3 g gefunden. Zuvor lag die maximal zu erhaltende Menge bei 100-150 mg. Weitere Vergrösserungen der Ansätze in dieser Stufe sind nach dem optimierten Verfahren durch einfaches „upscaling“ möglich. Die Photolysereaktion wurde vor allem hinsichtlich der Reaktionszeit und des Arbeitsaufwandes modifiziert, was durch den Einsatz eines hierfür entwickelten Reaktors gelang. Die Qualität des Produktes wurde durch die neue Verfahrensweise nicht beeinflusst.

Durch die genannten Veränderungen konnte die Totalausbeute über 6 Stufen für FNOCT von 9 % auf 10 % gesteigert werden. Für FNOCT/AM konnte die Totalausbeute von 8 % auf 12 % gesteigert werden. Die Steigerungen der Totalausbeuten sind damit nicht gravierend, zeigen aber, dass die Verfahrensumstellungen nicht mit Verlusten der Gesamtausbeute einher gehen.

Somit ist es gelungen, die Ketone **6** und **6e**, welche als stabile Depot-Verbindungen für die schwieriger lagerbaren Verbindungen FNOCT **7** und FNOCT/AM **7e** dienen, in einem Ansatz in Mengen um ca. 3 g darzustellen. Damit besteht die Möglichkeit, schnell und bedarfsgerecht FNOCT bzw. FNOCT/AM herzustellen. Dadurch kann man Qualitätsminderungen, die diese Moleküle durch lange Lagerungszeiten bei nicht optimalen Bedingungen erleiden können, vermeiden. Die Ketone sind unter Lichtausschluss über Jahre ohne Qualitätsverluste bei Raumtemperatur an der Luft haltbar.

## 4 Synthese und Syntheseveruche zur Darstellung neuer o-Chinodimethansysteme

Zur Synthese neuer o-Chinodimethane sind prinzipiell zwei Wege denkbar. Einerseits könnte ein anderes Fluorophor als Phenanthren in das bestehende Molekül eingebracht werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, das existierende Fluorophor hinsichtlich seiner Substituenten oder deren Position im Molekül zu verändern. Ziel dieser Manipulationen sollte eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge sein. Dies ist für Zellversuche wünschenswert, da Zellen bei längerer Bestrahlung mit Licht geringer Wellenlänge schnell sterben und so nicht die Möglichkeit besteht, Langzeitversuche an ihnen durchzuführen.

Andere Fluorophore als Phenanthren<sup>[69]</sup> ( $\lambda_{\text{exc}} = 253 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 367 \text{ nm}$ ) können z.B. Triphenylen<sup>[67]</sup> ( $\lambda_{\text{exc}} = 265 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 368 \text{ nm}$ ) oder Pyren<sup>[70]</sup> ( $\lambda_{\text{exc}} = 313 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 397 \text{ nm}$ ) sein. Dies könnte dann zu den in Abbildung. 4.1 dargestellten Molekülen führen.

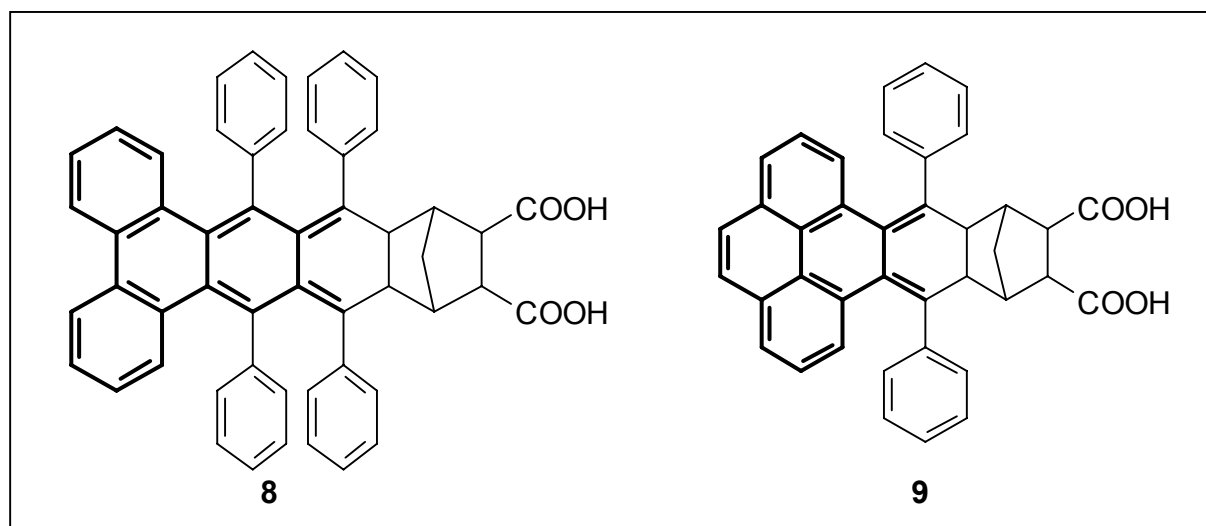


Abb. 4.1: Denkbare „o-Chinodimethane“ mit Triphenylen **8** bzw. Pyren **9** als Fluorophor.

Beide Moleküle sind auf Grund ihrer großen hydrophoben Gruppen wahrscheinlich noch schwerer in Wasser löslich als es bei dem o-Chinodimethan mit Phen-

anthrengerüst der Fall ist. Dies würde eine Anwendung im zellulären System erschweren. Gegebenenfalls wäre eine Modifizierung zur Löslichkeitsverbesserung (Einführung hydrophiler Substituenten in das Molekül) erforderlich. Bei Pyren kommt hinzu, dass es in höheren Konzentrationen (z.B. 1.00 g/L) zur Excimer-Bildung<sup>[70]</sup> neigt. Dadurch verändern sich die Fluoreszenzeigenschaften. Das Molekül zeigt dann bei gleicher Anregungswellenlänge ( $\lambda_{\text{exc}} = 313 \text{ nm}$ ) eine sich mit steigender Konzentration verstärkende Fluoreszenzbande bei  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$ . So wurde dem Triphenylen bei der Synthese eines neuen Fluoreszenzmarker-Systems der Vorzug gegeben.

Eine Veränderung der Position der Substituenten im existierenden Molekül bietet sich auf Grund des bei der Nitrierung von Phenanthren entstehenden in 4-Position substituierten Nitrophenanthrens an. Auch eine Nitrierung in 3-Position ist möglich, wenn auch durch elektronische Effekte erschwert. Ob diese Veränderungen zu einer batho-chromen Verschiebung der Anregungswellenlänge führen, könnte möglicherweise mittels Rechnungen vorausgesagt werden. Eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften sollte aber mit der Positionsverschiebung einher gehen. Abbildung 4.2 zeigt die denkbaren Derivate des FNOCT-Moleküls.

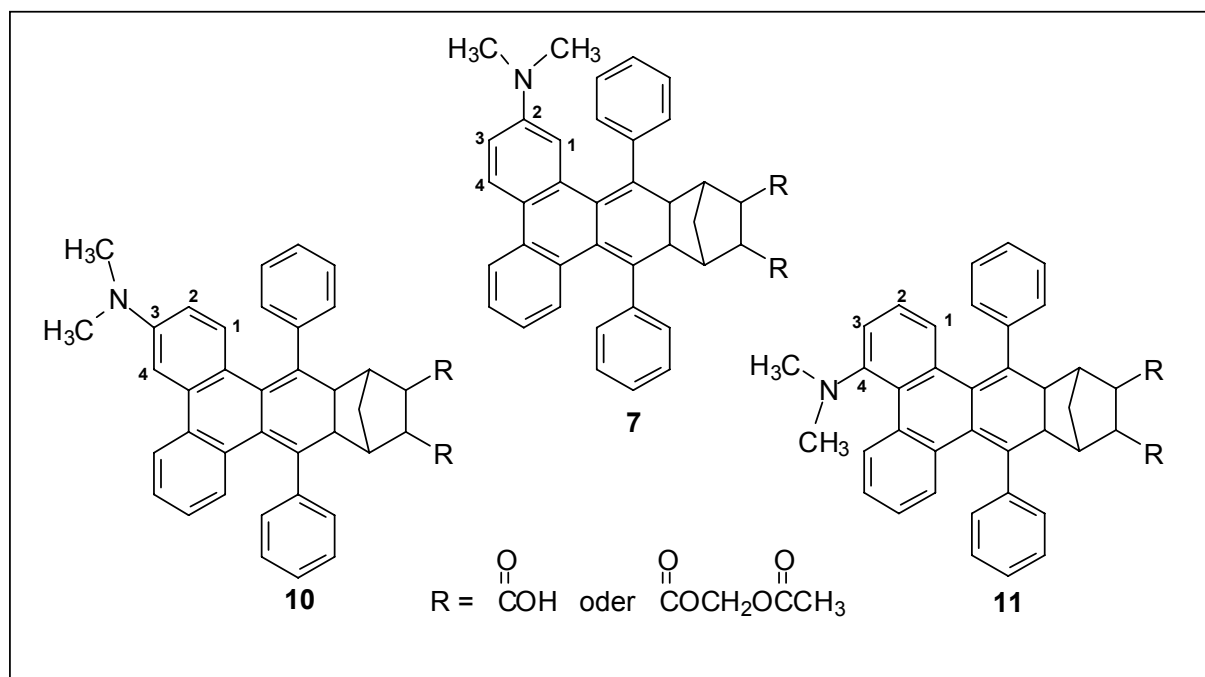


Abb. 4.2: Denkbare FNOCT-Derivate durch Änderung der Position des Substituenten: **7** Ausgangsmolekül (2-Position), **10** 3-Position, **11** 4-Position.

## 4.1 Syntheseversuche für einen Fluoreszenzmarker mit Triphenylen als Fluorophor

Die Synthese des Triphenylen-Derivates ging vom 9,10-Phenanthrenchinon (**1**) aus. Dieses wurde wie bei MEINEKE<sup>[63]</sup> und BÄTZ<sup>[71]</sup> beschrieben, mit 1,3-Diphenylpropan-2-on zu Phenanthrencyclon (**12**) umgesetzt. Nach JONES et. al.<sup>[72]</sup> sollte daraus in einer fünfstufigen Synthese 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-chinon (**16**) synthetisiert werden. Die aus den Angaben in der Literatur errechnete Gesamtausbeute der in Abbildung 4.3 dargestellten Reaktion betrug 23 %.

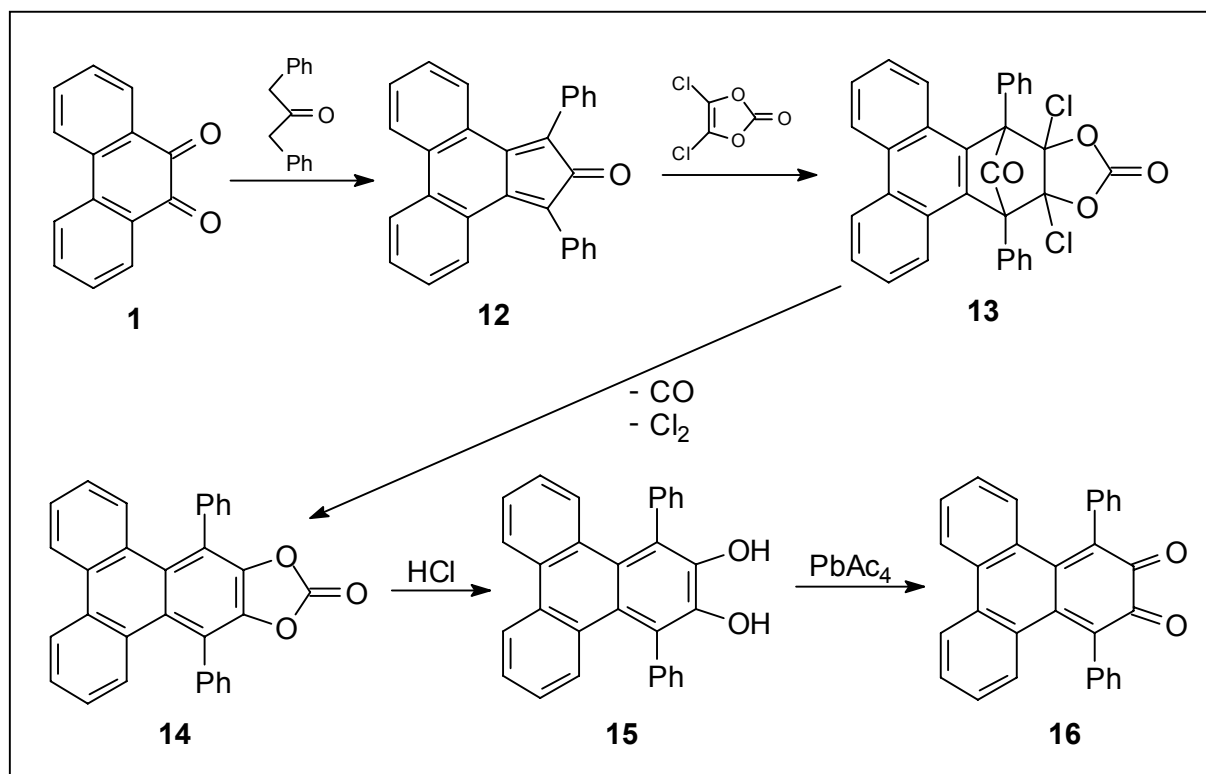


Abb. 4.3: Synthese von 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-chinon **16**.<sup>[72]</sup>

Das Chinon **16** sollte wiederum mit 1,3-Diphenylpropan-2-on zu einem Cyclon **17** umgesetzt werden. Dieses sollte dann schliesslich durch eine Diels-Alder-Reaktion mit Norbornendicarbonsäure das Endprodukt **18** liefern, das in Abbildung 4.4 dargestellt ist.

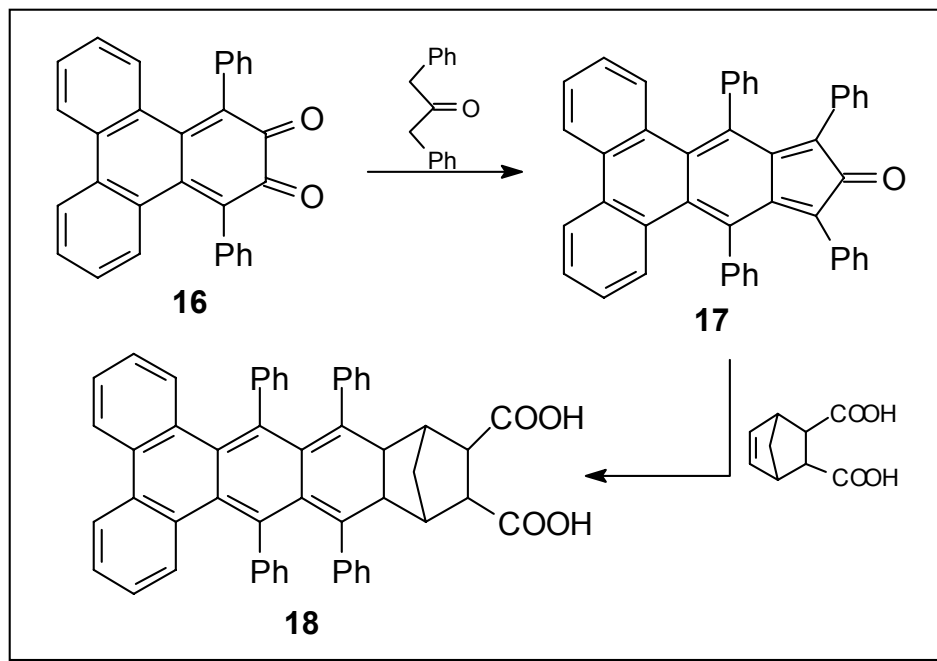


Abb. 4.4: Syntheseweg für den neuen Fluoreszenzmarker **18**.

Neben dem Phenanthrencyclon (**12**) musste in der Praxis zunächst das für die Diels-Alder-Reaktion zu **13** benötigte Dichlorovinylencarbonat (DCVC) (**21**) in einer zweistufigen Synthese nach Scharf<sup>[73]</sup> hergestellt werden. Die in Abbildung 4.5 dargestellte Chlorierung von Ethylencarbonat (**19**) zu Tetrachlorethylencarbonat (**20**) verlief nahezu quantitativ. Die anschliessende Abspaltung von  $\text{Cl}_2$  mit Zink konnte nur unter hohen Ausbeuteverlusten (20 % DCVC) durchgeführt werden, da sich bei der Entfernung des Lösungsmittels ein nicht charakterisierter polymerer Feststoff bildete. Ausserdem musste DCVC rasch verbraucht werden, da es sich zu Oxalylchlorid zersetzt.

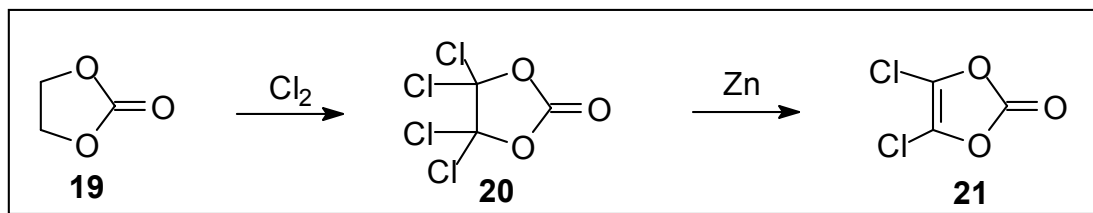


Abb. 4.5: Umsetzung von Ethylencarbonat (**19**) zu Dichlorvinylencarbonat (**21**)

Bei der Reaktion wurden insgesamt maximal 10.0 g DCVC erhalten. Dadurch konnte die anschliessende Diels-Alder-Reaktion nur in kleinen Ansätzen durchgeführt

werden. Da die Reaktion nicht erprobt war, wurde DCVC im Überschuss eingesetzt. Die Reaktion lieferte Ausbeuten von 57 % an Produkt **13**. Die Abspaltung von Chor aus dem Diels-Alder Addukt **13** verlief ebenfalls nicht quantitativ und lieferte 67 % eines Gemisches aus Edukt und Produkt **14**. Da der synthetische Aufwand bis zu dieser Stufe der Reaktion sehr gross war und die Substanz nur in geringen, verunreinigten Mengen angefallen war, wurde die Synthese zugunsten einer anderen Variante eingestellt.

Als Alternative wurde versucht, das käufliche Vinylencarbonat als Dienophil mit Phenanthrencyclon (**12**) umzusetzen. Eine ähnliche Reaktion mit Fluorencyclon als Dien ist in der Literatur<sup>[74]</sup> beschrieben. Die Diels-Alder-Reaktion verlief in Toluol mit einer Ausbeute von 75 %, wobei das Additionsprodukt **22** ohne weitere Reinigung verwendet werden konnte, da es als Feststoff in hoher Reinheit aus dem Reaktionsgemisch ausfiel (Abbildung 4.6).

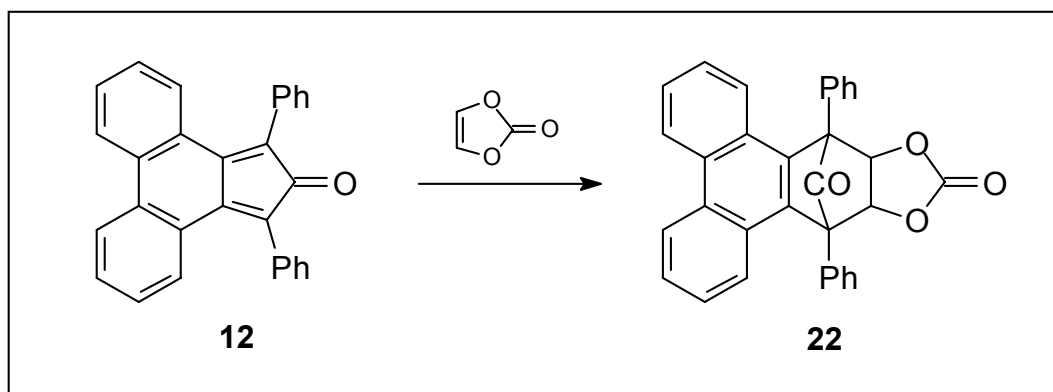


Abb. 4.6: Diels-Alder Reaktion von Phenanthrencyclon mit Vinylencarbonat zu Verbindung **22**.

Der nächste Reaktionsschritt umfasste eine Decarbonylierungsreaktion. Decarbonylierungen können sowohl auf thermischem als auch auf photochemischem Wege durchgeführt werden. Beide Reaktionsvarianten wurden ausprobiert:

- 1) Die thermische Decarbonylierung von **22** bei 165°C mit katalytischer Dehydrierung (Palladium/Aktivkohle) lieferte ein komplexes Substanzgemisch, welches mit ökonomischem Aufwand nicht trennbar war.
- 2) Der Vorteil der photochemischen Decarbonylierung besteht in den niedrigeren Temperaturen, bei denen die Reaktion ablaufen kann.<sup>[75]</sup> Bei der Reaktion wurde ein

Produktgemisch aus zwei Substanzen erhalten. Eine Literaturrecherche ergab, dass bei der Photolyse von **22** ein Monoalkohol **24** und ein Oxepin **25** gleicher Masse gebildet werden. Der Monoalkohol (1,4-Diphenyltriphenylen-2-ol) fällt als Nebenprodukt in geringen Mengen von etwa 5 % bei der Reaktion an.<sup>[75]</sup> (Abbildung 4.7).

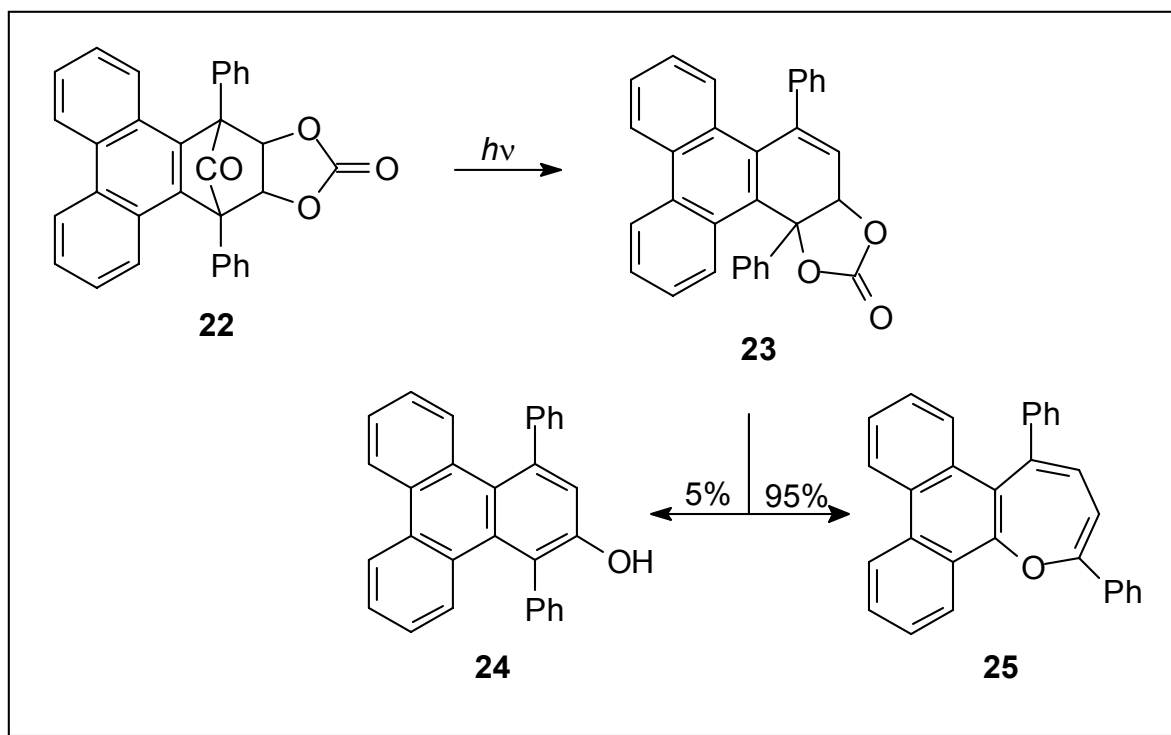


Abb. 4.7: Die Photodecarbonylierung von **22** liefert nach Abspaltung von  $\text{CO}_2$  aus dem umgelagerten Produkt **23** den Monoalkohol **24** und das Oxepin **25**.

Verbindung **23** ist das Produkt einer 1,5-Umlagerung, die bei der Photodecarbonylierung auftritt, da das o-chinoide System das stabilere Phenanthrenengerüst zurückbildet. Die Eliminierung von  $\text{CO}_2$  führt dann zu den Verbindungen **24** und **25**. Prinzipiell könnte ein Monoalkohol wie **24** durch Umsetzung mit Fremys Salz (Kaliumnitrosodisulfonat) in 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-chinon (**16**) überführt werden. Reaktionen dieser Art wurden in der Literatur<sup>[76]</sup> gefunden. Es zeigte sich aber, dass das Produkt der photochemischen Reaktion nicht mit Fremys Salz reagierte.

Da mit den hier beschriebenen Reaktionen keine Möglichkeit bestand, 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-chinon unter rechtfertigendem Aufwand in verwertbarer Menge und Reinheit herzustellen, und auch weitere Literaturrecherchen keine

einfacheren Wege der Darstellung dieses Moleküls ergaben, wurde die Synthese des Triphenylen-haltigen Fluoreszenzmarkers eingestellt.

## 4.2 Versuche zur Variation der Position des Substituenten im FNOCT- Molekül

### 4.2.1 Nitrierung

Wie in Kapitel 3 erwähnt erhielt man bei der Nitrierung von 9,10-Phenanthrenchinon mit 65 %iger Salpetersäure neben 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**) auch noch 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26**). Dieses Molekül fiel in etwas geringeren Mengen an, da diese Position sterisch durch Wechselwirkung mit dem Wasserstoffatom an C-5 des Phenanthrengerüsts gehindert ist (Abbildung 4.8). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten<sup>[61]</sup> konnte 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon isoliert und charakterisiert werden. Die Isolierung gelang durch die unterschiedliche Löslichkeit der Produkte in Ethanol. Während 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon nach dem Kochen in Ethanol wieder ausfiel, blieb 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon in Lösung und wurde nach Entfernen des Lösungsmittels als Feststoff erhalten. Die vollständige Reinigung gelang durch Umkristallisation in 50 %iger Essigsäure<sup>[65]</sup>.

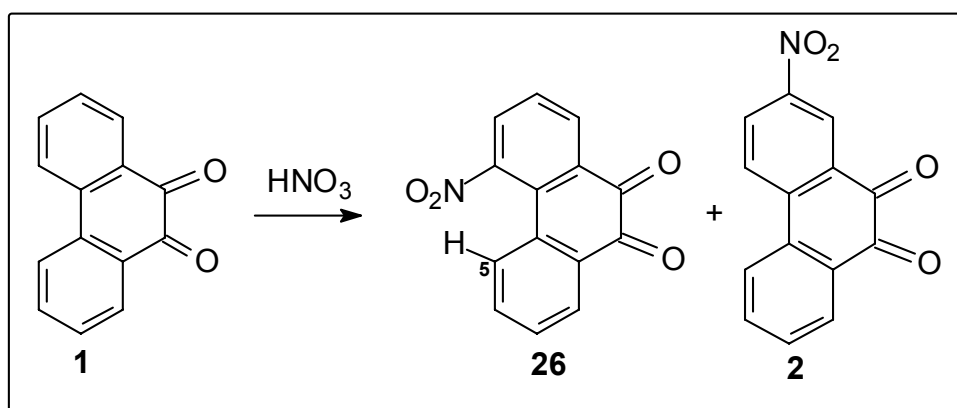


Abb. 4.8: Bildung von 4- Nitrophenanthren-9,10-chinon (**8**). In etwas höherer Ausbeute entsteht 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**) (siehe Kap. 3)

Die Unterschiede in der Ausbeute zwischen 2- und 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon betragen ca. 2 - 5 % zugunsten des 2- Nitro-Derivates.



Die Synthese von 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**29**) konnte auf diesem Wege nicht durchgeführt werden. Sie erfordert ein anderes Reaktionsverfahren<sup>[77]</sup>, da bei der Nitrierung von Phenanthrenchinon nur die 2- und die 4-Position im Molekül für den Angriff eines Elektrophils bevorzugt sind. Um den Substituenten in 3-Position in das Phenanthrengerüst einzubringen, musste zunächst die elektronische Situation des Moleküls verändert werden. Dies konnte nach der Umsetzung des Chinons mit Hydroxylaminhydrochlorid und Zinn-(II)-chlorid zu 9,10-Diaminophenanthrenhydrochlorid (**28**) erreicht werden<sup>[78]</sup>. Durch diesen Schritt wurden die Carbonyl-Gruppen, welche Elektronenakzeptoren sind, in zur Elektronenabgabe fähige Amino-Gruppen umgewandelt. Dadurch wurde die elektronische Struktur so beeinflusst, dass in 3-Position die ungünstige positive Partialladung in eine negative, für den Angriff eines Elektrophils geeignete Partialladung umgewandelt wurde. Die Reaktion verlief über die Bildung eines Hydroxylamins **27**, welches ohne Isolierung zu **28** umgesetzt wurde. Die Reaktionsschritte zeigt Abbildung 4.9.

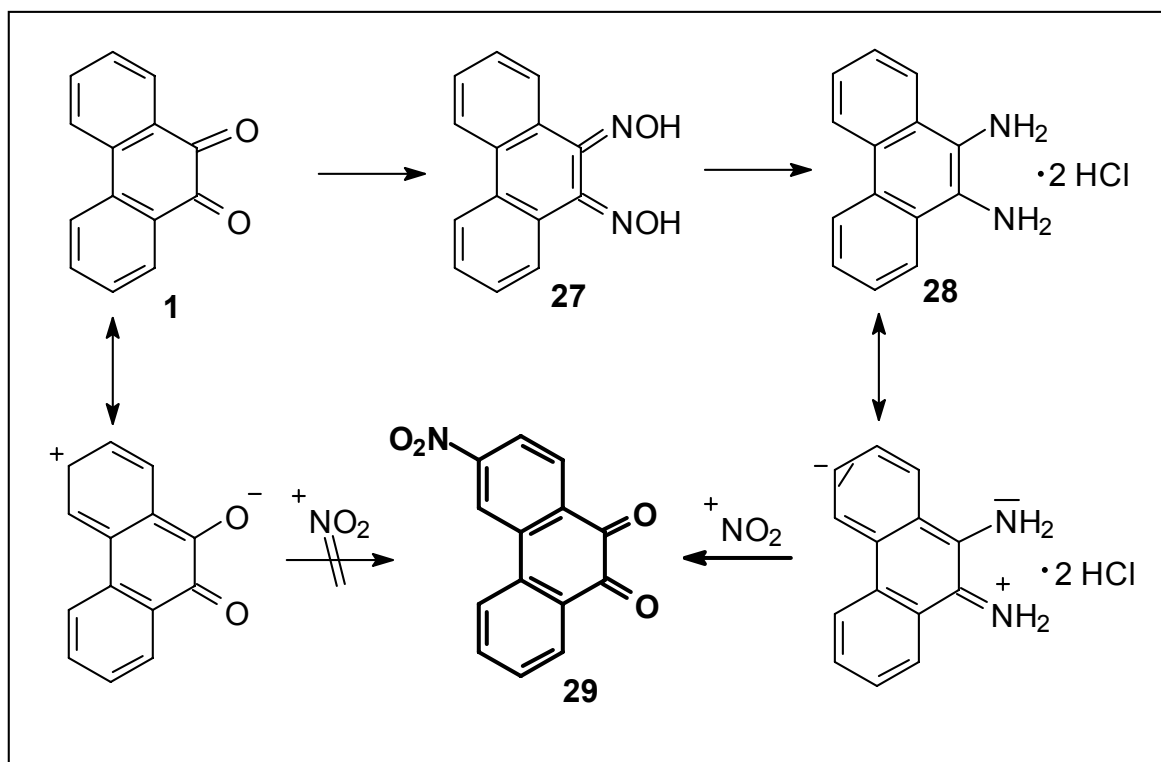


Abb. 4.9: Bildung von 9,10-Diaminophenanthrenhydrochlorid (**27**): Im Gegensatz zum Ausgangsprodukt **1** findet man eine veränderte elektronische Struktur, welche die Nitrierung in 3-Position ermöglicht (Produkt **29**).

Die Nitrierung des 9,10-Diaminophenanthrenhydrochlorid gelang nur unter extrem aggressiven Bedingungen. Sie erforderte den Einsatz des starken Nitrierungsreagenzes und Oxidationsmittels Acetylsalpetersäure und musste unter absolutem Ausschluss von Feuchtigkeit durchgeführt werden. 9,10-Diaminophenanthrenhydrochlorid wurde zunächst drei Tage lang im Ölpumpenvakuum getrocknet. Dann wurde **15** mit Eisessig und Essigsäureanhydrid unter Zusatz von trockenem Natriumacetat acetyliert. Zu dem Produkt wurde rauchende Salpetersäure getropft, was die Bildung von Acetylsalpetersäure bewirkt. Eine von SCHMIDT und SÖLL<sup>[77]</sup> für diese Reaktion verwendete Apparatur wurde nicht benutzt, sondern die Salpetersäure mittels Tropftrichter zugesetzt. Die Ausbeute der Reaktion betrug 24 %. Ein Grossteil des Hydrochlorids **28** wurde zum Ausgangsprodukt Phenanthren-9,10-chinon oxidiert. Dies war auch die ausschliesslich beobachtete Reaktion, wenn nicht vollständig wasserfrei gearbeitet wurde. Auch das erhaltene 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon war teils noch durch Phenanthren-9,10-chinon verunreinigt. Eine Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H- NMR-Spektrum konnte jedoch trotzdem vorgenommen werden. Bei dieser Reaktion entstanden aber auch noch eine Vielzahl weiterer Nitrierungsprodukte<sup>[77]</sup>, welche die Reinigung des gewünschten 3-Nitrophenanthren-9,10-chinons erschwerten. Ausserdem verliefen nicht alle Syntheseansätze, obwohl unter strengem Wasserausschluss durchgeführt, erfolgreich, so dass nur geringe, meist verunreinigte Produktmengen erhalten werden konnten. Da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen war, bei der anschliessenden Reduktion ein relativ reines Produkt zu erhalten, weil nur die Nitroderivate unter den verwendeten Bedingungen reagieren sollten, wurde trotz der genannten Probleme mit der Synthese fortgefahren.

#### 4.2.2 Reduktion und Methylierung

Reduktion und Methylierung von 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon und 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon verlaufen analog zu den Reaktionen des 2-Nitrophenanthren-9,10-chinons (siehe Kapitel 3) und sind in Abbildung 4.10 als Übersicht dargestellt.

Für die Reduktion von 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26**) wurde die Vorschrift von BRASS und FERBER<sup>[66]</sup> verwendet. Für die Synthese wurde hinsichtlich der Durchführung auf die bereits bei der Darstellung des 2-Aminophenanthren-9,10-

chinons erfolgreiche, optimierte Vorschrift zurückgegriffen. Die Reaktion wurde unter sehr viel milderen Bedingungen durchgeführt als die Reduktion von 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon, da das Molekül reaktiver ist. Als Reduktionsmittel wurde Natriumhydrogensulfid in alkalischer Lösung (0.10 M NaOH) verwendet. Die Reaktion lieferte bei einer Eduktmenge von 5.00 g ca. 4 g 4-Aminophenanthren-9,10-chinon (**30**). Das Produkt wurde zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeuteverluste bei diesem Schritt sind sehr viel geringer als bei der Umkristallisation von 2-Aminophenanthren-9,10-chinon, da das Produkt sehr gut auskristallisiert. Es wurden Ausbeuten von 88 % erhalten.

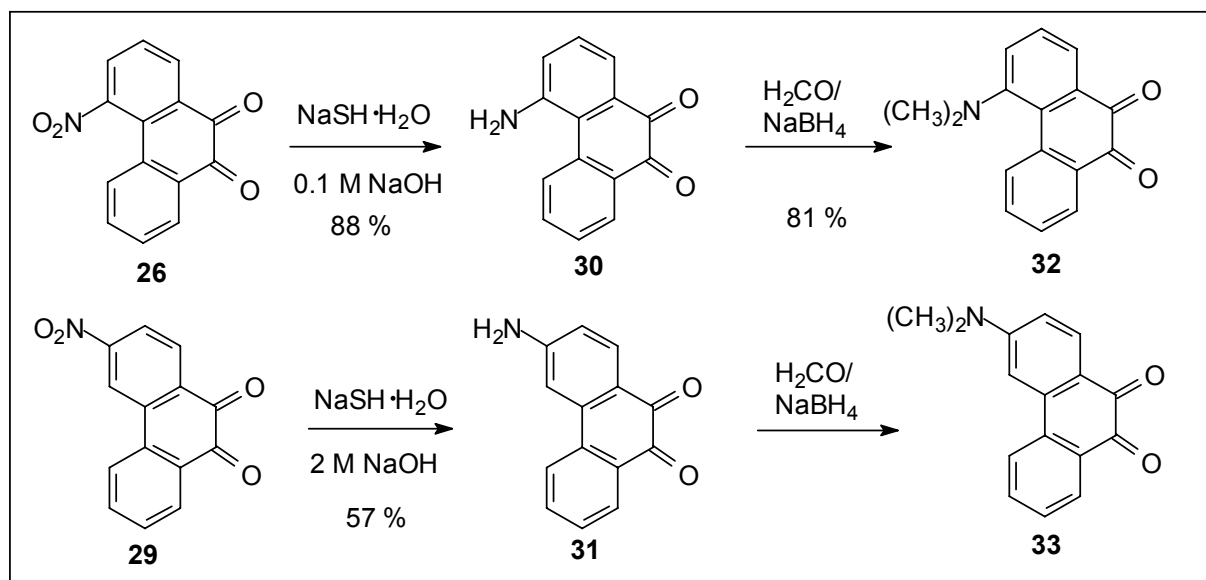


Abb. 4.10: Reduktion von 3- bzw 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26** und **29**) mit anschließender Methylierung der entstandenen Aminophenanthrenchinone **30** und **31**.

Die Reduktion von 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**29**) wurde nach der Literatur<sup>[78]</sup> in 2 M NaOH durchgeführt. Hier kam ebenfalls die für die Darstellung von 2-Aminophenanthren-9,10-chinon optimierte Vorschrift zum Einsatz. Als Reduktionsmittel wurde Natriumhydrogensulfid verwendet. Das eingesetzte Edukt war noch durch Phenanthren-9,10-chinon und geringe Mengen anderer nicht identifizierter Substanzen verunreinigt, welche nicht abgetrennt werden konnten. Im Zuge der Reduktionsreaktion konnten die Verunreinigungen zwar verringert werden, eine vollständige Abtrennung gelang jedoch auch nach Umkristallisation des Produktes in Ethanol nicht. Die Ausbeute betrug 57 %.

Die Methylierung beider Aminophenanthrenchinone **30** und **31** wurde analog zur Methylierung des 2-Aminophenanthren-9,10-chinons mit geringen Abweichungen durchgeführt.<sup>[67]</sup> Die für die Darstellung von N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon optimierte Vorschrift für eine Leukert-Wallach-analoge Reaktion mit Formaldehyd und Natriumborhydrid erwies sich auch für die Synthese von **32** als erfolgreich. Das Monomethylderivat N-Methyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon wurde nicht gefunden. Eine Abtrennung geringer Verunreinigungen konnte wie bei der Reinigung des N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinons über eine kurze Kieselgelsäule mit Toluol und Ethylacetat (4:1) als Laufmittel erfolgen. Für N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon **32** konnte eine Ausbeute von 81 % erzielt werden.

Da für die Methylierung von 3-Aminophenanthren-9,10-chinon (**31**) nur verunreinigte Edukte zur Verfügung standen, konnte die Reaktion zwar ebenfalls erfolgen, N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-chinon (**33**) konnte jedoch nur in geringen Mengen (ca. 80.0 mg) und Ausbeuten (29 %) erhalten werden. Die Reinigung des Produktes erwies sich als sehr aufwändig. So musste das Rohprodukt mehrfach säulenchromatographisch gereinigt werden. Als bestes Laufmittel konnte nach einer Vielzahl von Versuchen reines Ethylacetat ermittelt werden. Letztlich konnten nur die NMR-Spektren Auskunft über Struktur und Reinheit des entstandenen Produktes geben.

Aus den genannten Gründen erwies sich die Synthese des N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-chinons (**33**) als sehr zeit- und vor allem materialintensiv, wobei sie nur geringe Mengen des Produktes lieferte, die einer aufwändigen Reinigung bedurften. So wurde von einer weiteren Umsetzung zum N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-cyclon im Rahmen dieser Arbeit abgesehen und die weiteren Versuche auf die erfolgversprechendere Synthese des N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-cyclons (**34**) konzentriert.

#### 4.2.3 Aldolkondensation und Diels-Alder-Reaktion

Für die Aldolkondensation und die anschliessende Diels-Alder-Reaktion liegen keine Literaturvorschriften vor. Es wurde aber das Verfahren aus der Synthese des in 2-

Position substituierten Derivates übernommen. Die Reaktionsschritte zeigt Abbildung 4.11.

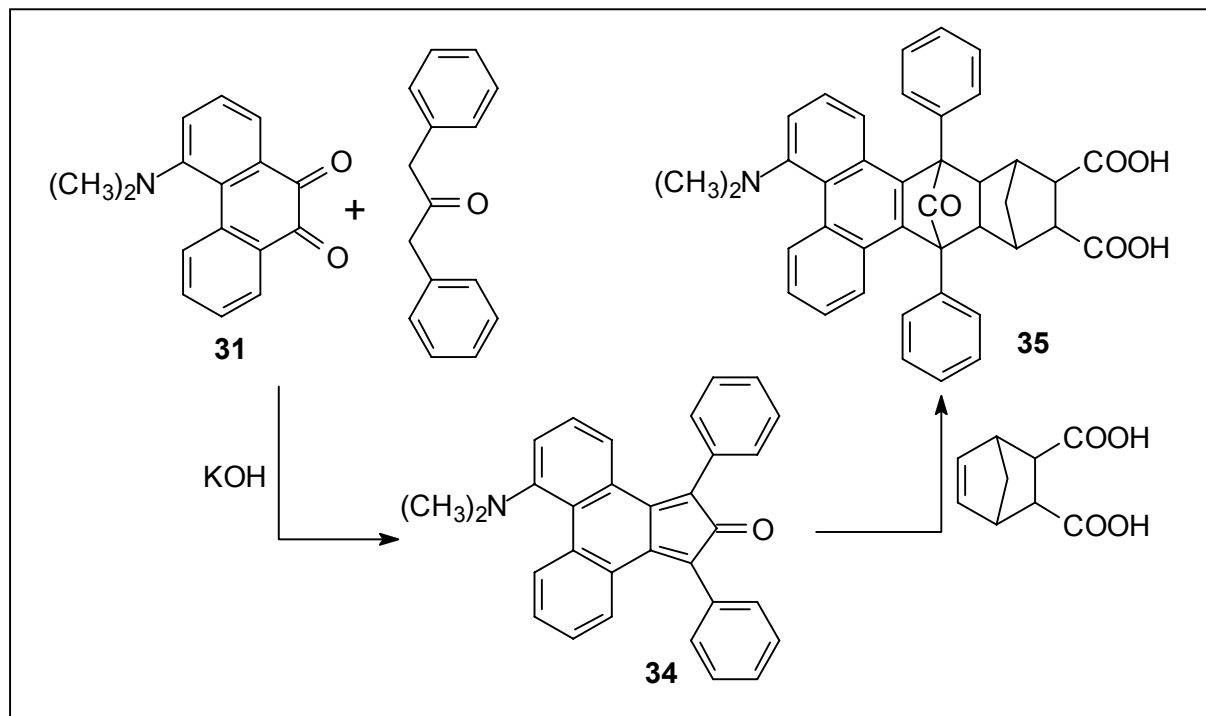


Abb. 4.11: Aldolkondensation von N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon **31** mit 1,3-Diphenylpropan-2-on zum Cyclon **34**. Anschliessend erfolgt eine Diels-Alder-Reaktion mit Norbornendicarbonsäure zu **35**.

So wurde die **Kondensation** zunächst wie bei der Synthese von N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-cyclon bei 55°C mit Kaliumhydroxid als Base durchgeführt. Auch die Reihenfolge, in der die Edukte zusammengegeben wurden, wurde beibehalten (siehe Kapitel 3.2). Anstelle des erwarteten dunkelgrünen Produktes wurde eine gelb-braune Reaktionslösung erhalten, aus der kein Feststoff ausfiel. Die Reaktion lieferte ein nicht trennbares Produktgemisch. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Produkte zeigte mehrere schlecht getrennte gelbe Fraktionen. Einzelne Komponenten konnten nicht identifiziert werden.

Daher wurden Versuche unternommen, das Syntheseverfahren zu modifizieren. Da sich 4-Aminophenanthren-9,10-chinon bei der Darstellung bereits als reaktiver erwiesen hatte als das 2-Aminophenanthren-9,10-chinon, wurde angenommen, dass N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon in der Aldolkondensation ebenfalls viel reaktiver ist. Erste Versuche bestanden in der Variation der Basenkonzentration

und in der Auswahl der Art der Base. Das Lösungsmittel Ethanol wurde durch Methanol und Isopropanol substituiert, da die Möglichkeit bestand, dass das Produkt in Ethanol löslich war. Alle diese Variationen führten jedoch nicht zu dem gewünschten Produkt. Auch weitere Versuche, die Reihenfolge der Zugabe der Edukte zu ändern, brachte keine Fortschritte. Der letzte Parameter, der variiert werden konnte, war die Reaktionstemperatur. Sie wurde zunächst um 10°C auf 45°C gesenkt, wodurch zumindest das gewünschte Reaktionsprodukt entstanden war und dünnschichtchromatographisch als grüne Zone nachgewiesen wurde. Es war jedoch noch stark durch gelbe Zersetzungsprodukte verunreinigt und konnte nicht isoliert werden. Da dies anscheinend ein vielversprechender Weg war, wurde die Reaktion bei 20°C durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden ansonsten wie unter Kapitel 3.2 beschrieben gewählt. Da bei diesem Ansatz nur 200 mg des Eduktes **31** eingesetzt wurden, wurde die Reaktion in einem Spitzkolben durchgeführt. Es erwies sich als vorteilhaft, wenn die Reaktionsmischung durch kräftiges Schütteln sehr gut vermischt wurde. So konnte auch das bei dieser Temperatur nur schwer lösliche Edukt nach und nach abreagieren, indem durch die Bildung des Produktes das Edukt der Lösung entzogen wurde. Der ausgefallene dunkelgrüne Feststoff wurde abfiltriert und mit sehr wenig Ethanol nachgewaschen, da er sich in diesem Lösungsmittel etwas löst. Ein Dünnschichtchromatogramm des Feststoffes zeigte neben einer grünen Fraktion noch eine gelbe Verunreinigung. Unter identischen Bedingungen konnte der Versuch reproduziert werden. Dass aber noch ein grosser Anteil an Neben- und Zersetzungsprodukten bei dieser Reaktion entstanden ist, zeigt die sehr geringe Ausbeute von 3 %. Von einer Reinigung ist wegen der schnellen Zersetzung des Produktes abzusehen. Eine gezielte Optimierung der Reaktionsbedingungen, z.B. weitere Absenkung der Temperatur, könnte aber sicherlich Ausbeute und Reinheit des Produktes weiter erhöhen. Trotz der vorhandenen Verunreinigungen wurde das erhaltene Produkt **34** in der folgenden Diels-Alder-Addition umgesetzt, da nur **34** auf Grund seiner Eigenschaft als Dien, nicht aber die Verunreinigungen in einer [4+2]-Cycloaddition reagieren können.

Für die **Diels-Alder-Reaktion** zum Keton **35** wurde die optimierte Vorschrift für die Reaktion von N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-cyclon mit Norbornendicarbonsäure verwendet. Die Edukte wurden 8 h bei 130°C unter Rückfluss erhitzt, wobei ein hellbrauner Feststoff ausfiel. Nach Isolierung und Reinigung mit Toluol und

Chloroform wurde eine Ausbeute von 41 % erzielt. Ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte Verunreinigungen von bis zu 50 % nicht abreagierter Norbornendicarbonsäure. Aufgrund der geringen Produktmenge wurde auf eine Umkristallisation verzichtet. Die notwendige Menge an Norbornendicarbonsäure war nur schwer zu bestimmen, da die Menge an Verunreinigungen, die in **34** enthalten sind, nicht sicher quantifiziert werden konnte. Bei einem kleinen Überschuss (ca. 13 %) an **34** gegenüber der Norbornendicarbonsäure verringerte sich zwar die Ausbeute des Produktes **35** auf ca. 30 %, es wurden jedoch nur noch Spuren (ca. 1.5 %) von Norbornendicarbonsäure gefunden. So scheint dies ein Ansatz für die Optimierung der Reaktion zu sein.

Von dem Reaktionsprodukt **35** konnten konzentrationsabhängige Fluoreszenz-emissions- und Anregungsspektren in Tetrahydrofuran aufgenommen werden. Diese sind in Abbildung 4.12 und 4.13 dargestellt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte durch Anregung jeweils im Maximum des Spektrums ( $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{--}345\text{ nm}$ ). Die Emissionsspektren wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 455\text{ nm}$  aufgenommen.

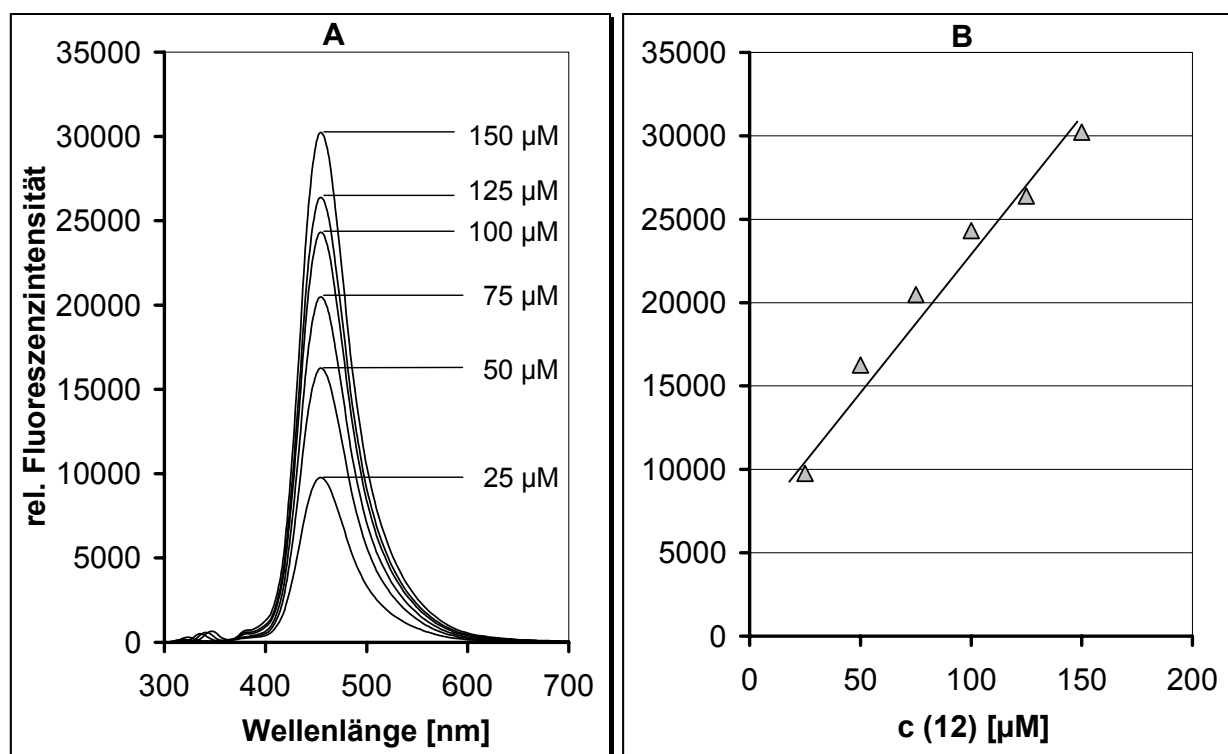


Abb. 4.12: **A)** Emissionsfluoreszenzspektren des Ketons **35** bei unterschiedlichen Konzentrationen, gemessen in Tetrahydrofuran. Anregung konzentrationsabhängig bei  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{--}345\text{ nm}$ . **B)** Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität von der Konzentration an **35**.

In Abbildung 4.12 B, kann man eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration an **35** und der Fluoreszenzintensität bis zu Lösungen mit Konzentrationen von 150  $\mu\text{M}$  erkennen. Auch das Maximum der Fluoreszenzemissionsbande liegt unabhängig von der Konzentration bei  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ . Anders verhält sich dies bei den in Abbildung 4.13 dargestellten Anregungsspektren der Verbindung **35**.

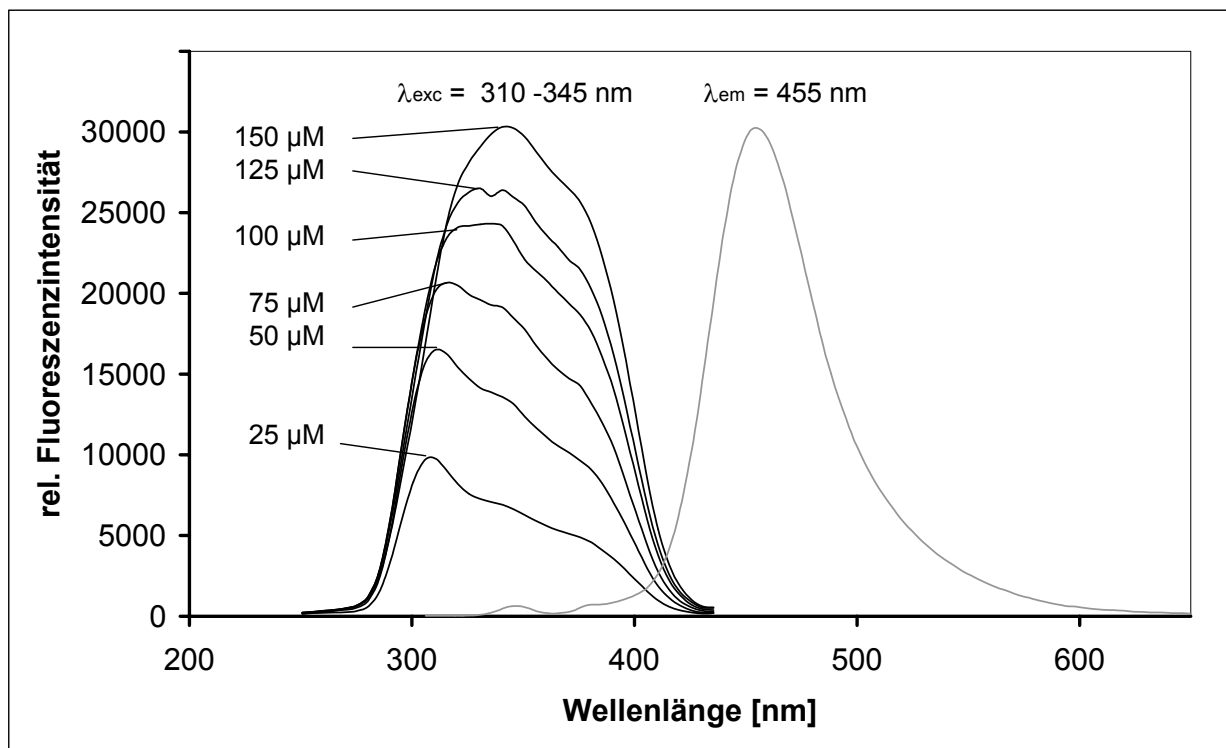


Abb. 4.13: Konzentrationsabhängige Anregungsspektren von Verbindung **35**. Verschiebung des Maximums mit steigender Konzentration von 310 nm zu 345 nm. Das Emissionsspektrum wurde bei  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$  aufgenommen. Lösungsmittel: Tetrahydrofuran.

Die Anregungsspektren zeigen eine Konzentrationsabhängigkeit sowohl hinsichtlich des Anstiegs der Fluoreszenzintensität als auch der Lage des Maximums. Dies liegt bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  bei  $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$  und wird sukzessive mit ansteigender Konzentration bis zu 150  $\mu\text{M}$  bathochrom nach  $\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$  verschoben. Ein Grund hierfür ist vermutlich ein physikalischer Effekt: durch die



technischen Gegebenheiten des Spektrometers<sup>a</sup> kann möglicherweise die intensivere Bande bei 310 nm nicht in ihrer vollen Intensität dargestellt werden. Dies könnte zu einer vermeindlichen Intensivierung der Bande bei 345 nm führen. Das Emissionsmaximum verändert sich dabei hinsichtlich seiner Lage bei  $\lambda_{em} = 455$  nm und Form nicht, weshalb Excimerbildungen ausgeschlossen werden können. Eine Auftragung der Punkte aus den Maxima der Anregungsspektren in einem Konzentrations-Intensitäts-Diagramm ist nahezu mit dem aus den Emissionsspektren erstellten Diagramm (4.12 B) identisch (Daten nicht abgebildet).

Von einer 50  $\mu$ M Lösung des Ketons **35** wurde ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Dieses zeigt Abbildung 4.14 im Vergleich mit dem bei gleicher Konzentration aufgenommenen Fluoreszenzanregungsspektrum.

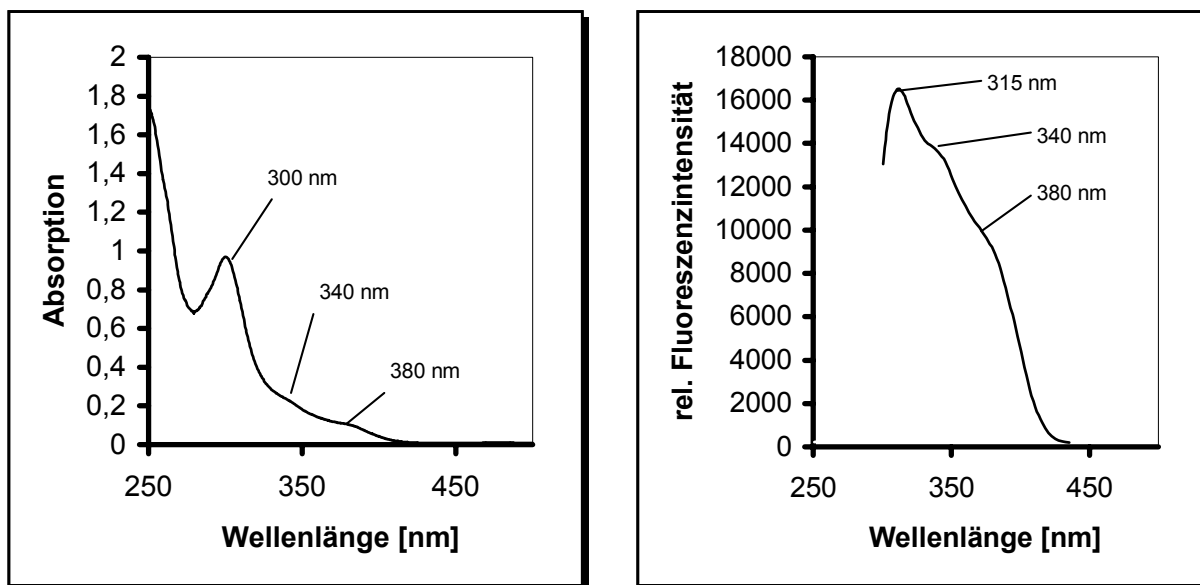


Abb. 4.14: Vergleich von Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektrum des Ketons **35**. Für beide Messungen betrug die Konzentration 50  $\mu$ M des Ketons **35** in Tetrahydrofuran.

Bei der vergleichenden Betrachtung von Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektrum aus Abbildung 4.14 wird eine gute Übereinstimmung zwischen beiden gefunden. Abweichungen sind auf die unterschiedliche Messtechnik, aber auch im

<sup>a</sup> Die Leistung der Lichtquelle des Spektrometers ist unterhalb von 300 nm zu schwach, um die Intensität des Spektrums korrekt wieder zu geben (siehe auch Kapitel 5.2.2).

Bereich kleiner Wellenlängen (250-300 nm) auf in Kap. 5.2.2 erklärte „technische“ Gegebenheiten des Fluoreszenzspektrometers zurückzuführen.

#### 4.2.4 Photolyse

Die photolytische Darstellung des FNOCT-Derivates **11** erfolgte in einem Quarz-NMR-Röhrchen in deuteriertem Tetrahydrofuran, um den Fortgang der Reaktion beobachten zu können. Dieses wurde in einen Kühlmantel eingehängt und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  mit Licht der Wellenlänge 300 nm bestrahlt. Die Photolysereaktion ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

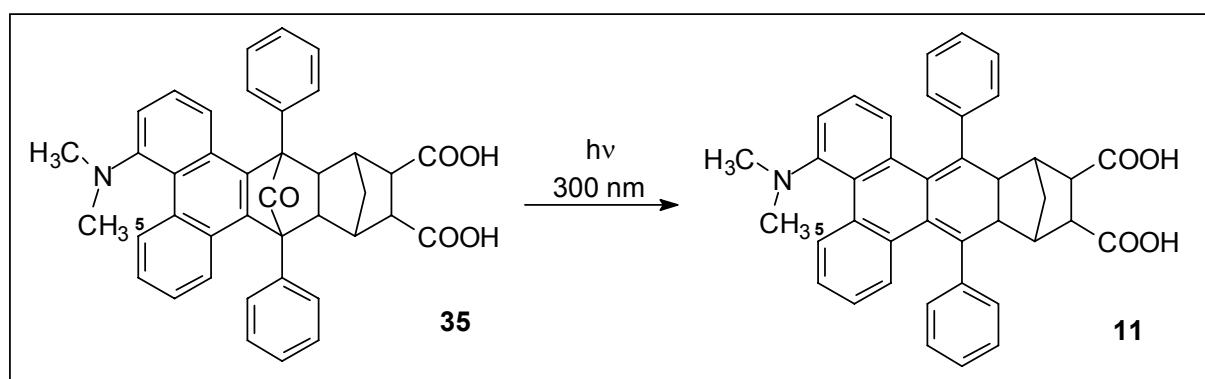


Abb. 4.15: Umsetzung des Diels-Alder-Adduktes **35** mittels Licht der Wellenlänge 300 nm zum FNOCT-Derivat **11**. Die Zahl 5 bezeichnet die Position des zur Beobachtung des Verlaufs der Photolyse verwendeten Protons im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums.

Photolytische Reaktionen bei hoher Konzentration, wie sie für NMR-Messungen notwendig sind, benötigen lange Reaktionszeiten, wenn die Produkte Licht im gleichen Wellenlängenbereich absorbieren, wie die Edukte. So wurde die vorliegende Probe für 81 h bestrahlt. Dabei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Spektren aufgenommen. Der Anstieg eines charakteristischen Protonensignals (es handelt sich um das sehr tieffeldverschobene Proton in Position 5 (Abbildung 4.15)) des Produktes **11** bei 8.35 ppm wurde beobachtet. Dieses Protonensignal und das noch nicht vollständig abgebaute Protonensignal des Protons 5 im Edukt **35** wurden am Ende der Reaktion für die Bestimmung des Umsatzes der Reaktion verwendet. Der prozentuale Anstieg des Umsatzes, also der Anstieg des Protonensignals mit der Zeit ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

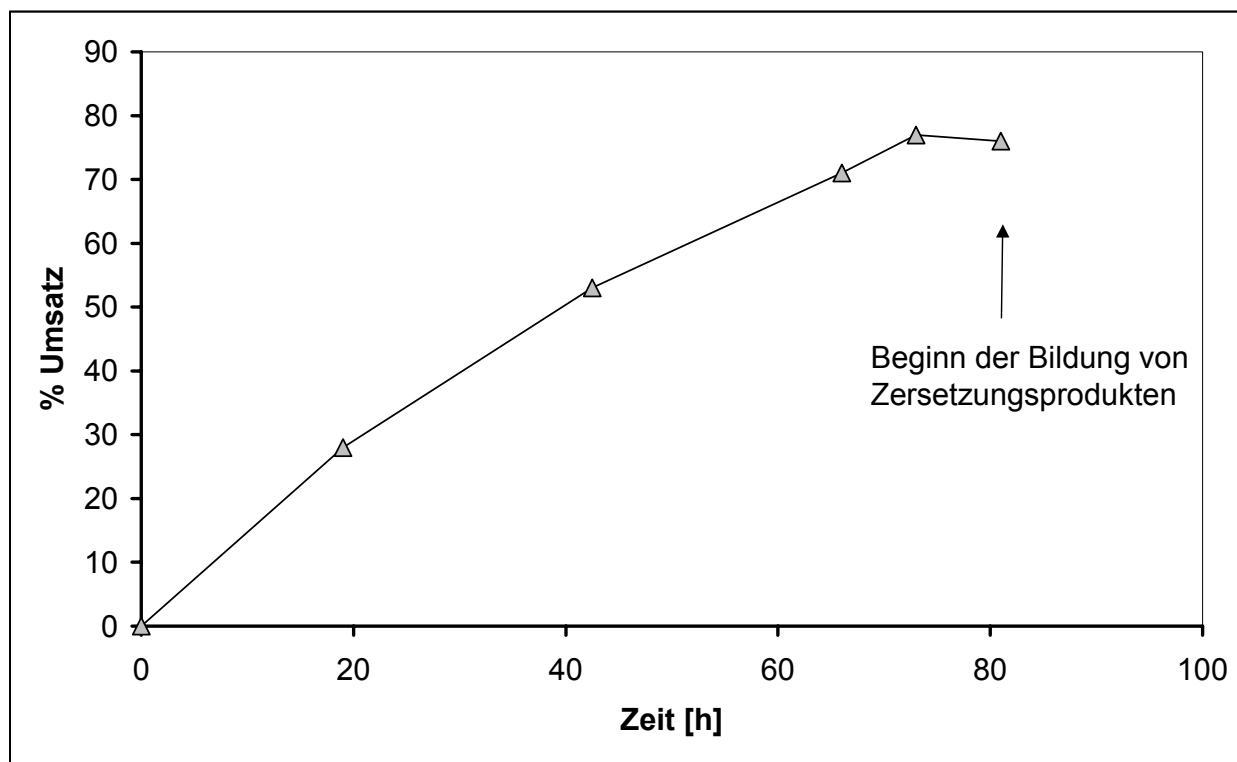


Abb. 4.16: Photolyse von **35** zum FNOCT-Derivat **11**. Nach 73 h ist ein Umsatz von 77 % erreicht. Weitere Bestrahlung führt vermutlich zur Bildung von Neben- oder Zersetzungsprodukten.

Ab einem Umsatz von 77 % fand keine weitere Zunahme der Produktbildung mehr statt, was vermutlich auf die photochemische Weiterreaktion zu Zersetzungsprodukten zurückzuführen war. Dies war an der Bildung weiterer Signale im NMR-Spektrum erkennbar. Die Photolyse wurde deshalb zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt. Von dem Produkt konnte ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen werden. Abbildung 4.17 zeigt Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum der Verbindung.

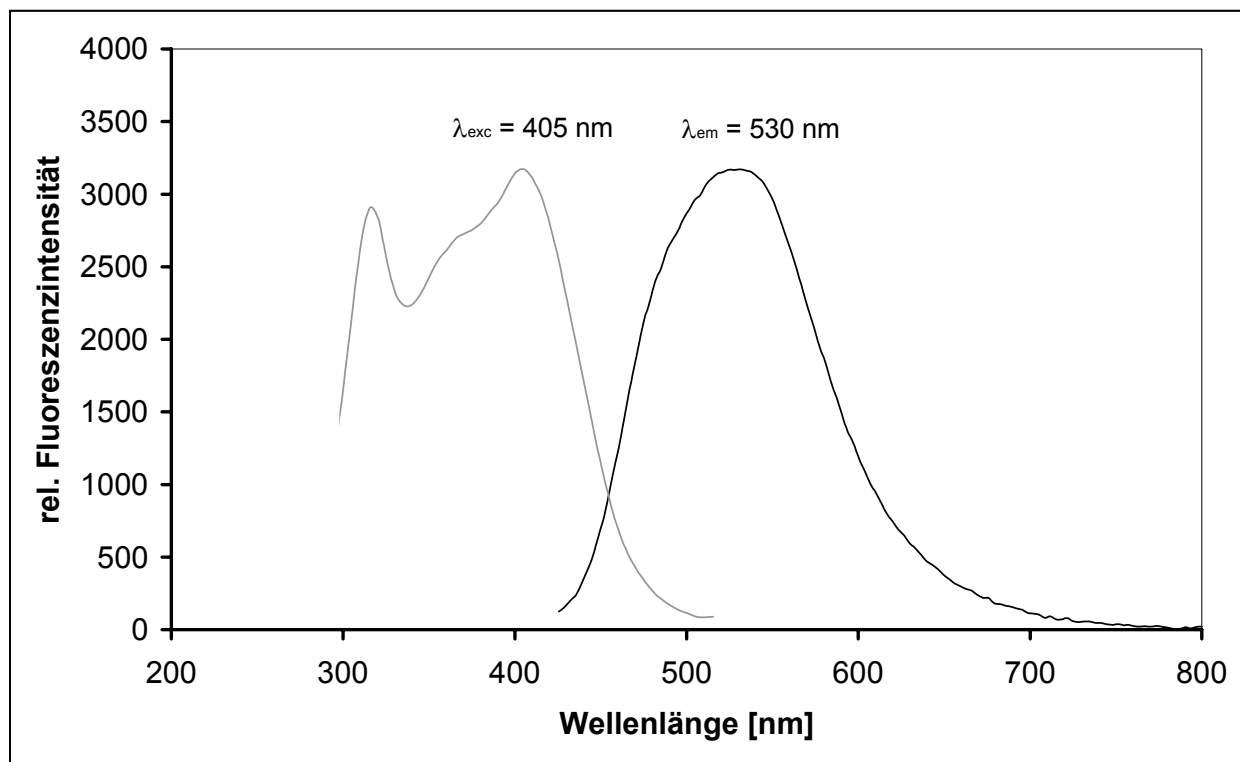


Abb. 4.17: Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum von Verbindung **11** bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran. Bei ca. 310 nm sind im Anregungsspektrum Reste des Ausgangsketons **35** erkennbar.

Beim Vergleich des Spektrums von **11** in Abbildung 4.17 mit den Fluoreszenz-emissions- und Anregungsspektren der FNOCT-Verbindung **7** (siehe Kap. 5), werden gute Übereinstimmungen hinsichtlich der Form und auch der Lage der Maxima der Spektren gefunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei Verbindung **11** um ein o-chinoides System handelt. Ein Beweis für die Funktionsfähigkeit der neuen Verbindung kann durch Reaktion von **11** mit Stickstoffmonoxid erbracht werden. Dabei sollte wie bei Derivat **7** die Fluoreszenz durch Bildung eines Hydroxylamins ansteigen. So wurden zu einer Messlösung von 50  $\mu\text{M}$  der Verbindung **11**<sup>b</sup> in Phosphatpuffer (pH = 7.24) 50  $\mu\text{M}$  MAHMA/NO zugegeben. Der Zerfall des Diazeniumdiolates wurde, wie in Abbildung 4.18 dargestellt, durch Anstieg der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{em}} = 471 \text{ nm}$  mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$  verfolgt (Kurve A). Zum Vergleich wurde das gleiche NONOat mit Verbindung **7** umgesetzt (Kurve B).

<sup>b</sup> Beim Ansatz der Stammlösung wurde die mindere Reinheit von Verbindung 11 berücksichtigt.

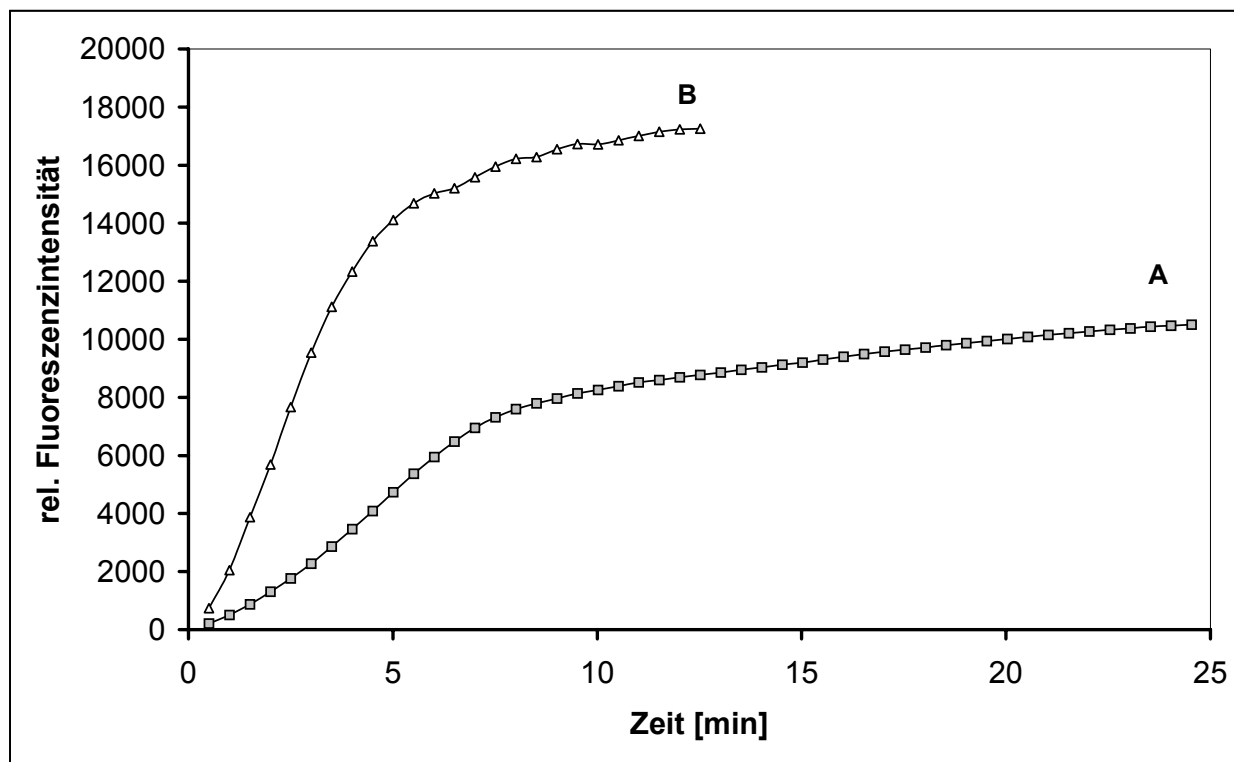


Abb. 4.18: Kinetik des Abfangs von NO durch A) FNOCT **11** und im Vergleich B) durch FNOCT **7**. Bedingungen: je 50  $\mu\text{M}$  FNOCT **11** und **7**, 10 % Pluronic und 50  $\mu\text{M}$  Glutathion als Reduktionsmittel. Beiden Proben wurde MAHMA/NO (Gesamtkonzentration: 50  $\mu\text{M}$ ) in Abwesenheit von Sauerstoff bei 25°C zugesetzt. Detektion: FNOCT **7**:  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$ , FNOCT **11**:  $\lambda_{\text{exc}} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 471 \text{ nm}$ .

Bei Betrachtung der Kurven A und B in Abbildung 4.18 fällt zunächst der Unterschied in der Endfluoreszenzintensität auf. Dies deutet auf eine um ca. 50 % geringere Fluoreszenzausbeute des Hydroxylamins **11-NOH** gegenüber dem Hydroxylamin **7-NOH** hin. Auch beim Vergleich der entsprechenden Ketone ist dies zu beobachten. Keton **6** erreicht bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran eine Grenzfluoreszenz von etwa 38.000 relativen Einheiten, während die des Ketons **35** unter gleichen Bedingungen bei ca. 16.000 Einheiten liegt. So kann für Ketone und Hydroxylamine ( an konkreten Beispielen) je ein Faktor berechnet werden:

$$\frac{\text{Keton } \mathbf{35}}{\text{Keton } \mathbf{6}} = \frac{16256}{38513} = 0.42$$

$$\frac{\text{Hydroxylamin } \mathbf{11-NOH}}{\text{Hydroxylamin } \mathbf{7-NOH}} = \frac{11208}{23097} = 0.49$$

Dieser Faktor spiegelt unter der Bedingung, dass jeweils gleiche Konzentrationen beider Verbindungen vorliegen, näherungsweise die relative Quantenausbeute der Verbindungen **35** und **11-NOH** in Bezug auf die Verbindungen **6** und **7-NOH** wieder.

Ein Vergleich der NO-Abfangreaktionen, die unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurden, zeigt, dass NO durch FNOCT **7** schneller abgefangen wird als durch FNOCT **11**. Werden die Daten beider Kurven durch eine empirische Anpassung ausgewertet, können mit Hilfe der Endwerte dieser berechneten Kurven Halbwertszeiten von 5.5 min für Kurve A und 2.1 min für Kurve B abgeschätzt werden. Kurve B gibt damit den Literaturwert<sup>[26]</sup> von 1-3 min für die Halbwertszeit von MAHMA/NO bei 25°C wieder. Für das FNOCT-System **11** wird eine um etwa den Faktor 2 geringere Reaktionsgeschwindigkeit gefunden. Der sigmoide Verlauf beider Kurven liefert einen Hinweis darauf, dass die Reaktion der FNOCT-Derivate mit NO hinsichtlich ihres kinetischen Ablaufs nicht einfach beschrieben werden kann. Diese Problematik wird an anderer Stelle (siehe Kapitel 5.3.1) noch ausführlich behandelt. Wurde statt Glutathion ein anderes Reduktionsmittel (Ascorbinsäure) bei der Messung verwendet, wirkte sich dies kaum auf die Kurvenform aus.

Nachdem die Reaktion von **11** mit Stickstoffmonoxid abgeschlossen war, wurden Gesamtspektren des Reaktionsproduktes, des Hydroxylamins **11-NOH**, direkt aus der Messlösung aufgenommen. Abbildung 4.19 zeigt Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektrum des Hydroxylamins **11-NOH**.

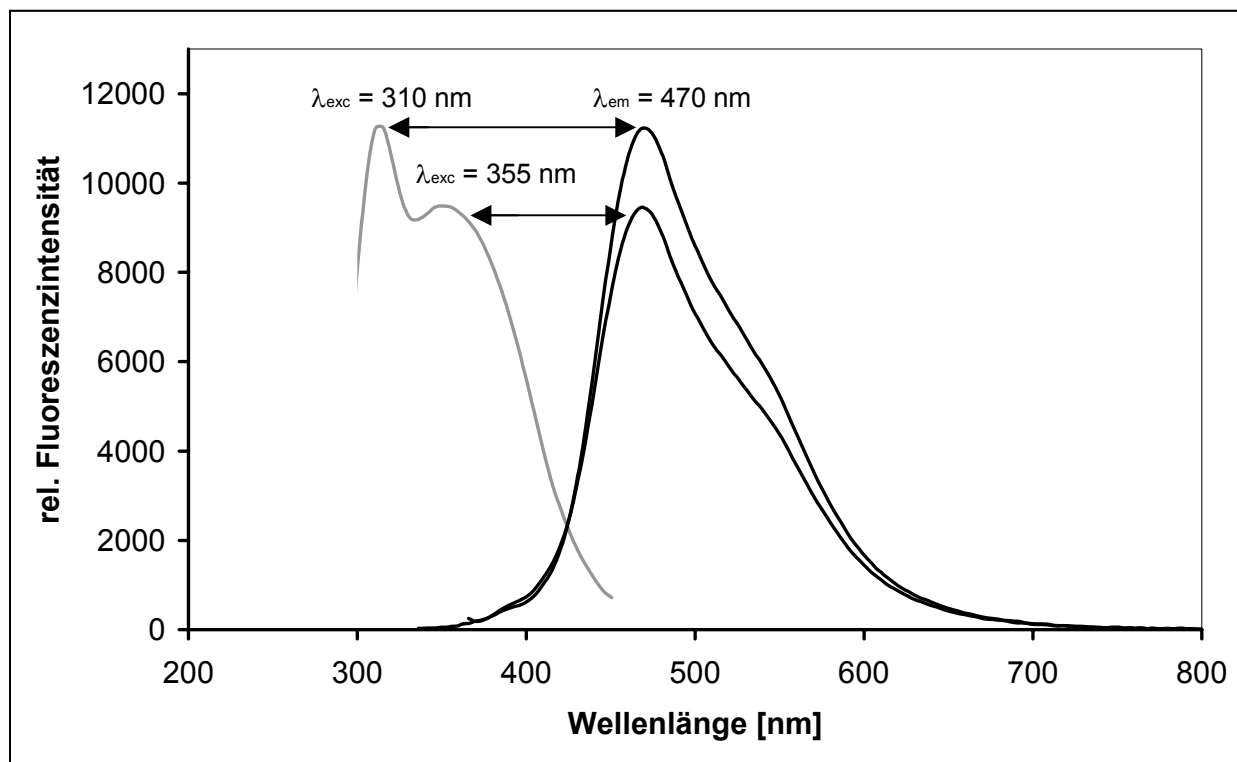


Abb. 4.19: Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren des Hydroxylamins **11-NOH**, gebildet nach Zugabe von MAHMA/NO (Konz.: 50  $\mu\text{M}$ ) zu einer Lösung aus 50  $\mu\text{M}$  FNOCT **11** und 50  $\mu\text{M}$  Glutathion in Phosphatpuffer (pH = 7.24). Im Emissionsspektrum sind zwischen 500 und 600 nm noch Anteile nicht abreagierten FNOCTs als Schulter erkennbar.

Im Emissionsspektrum ist noch deutlich eine Schulter bei ca. 550 nm zu erkennen. Dies zeigt, dass FNOCT **11** nicht vollständig mit NO reagiert hat, obwohl das NONOat in äquimolarer Menge zugesetzt wurde. Dies bedeutet, dass NO im doppelten Überschuss vorlag und somit den Fänger vollständig hätte zum Hydroxylamin umsetzen müssen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine schlechtere Bindung des Stickstoffmonoxids an das o-chinoide System des FNOCT **11** sein. Dies könnte dann zu einer reversiblen Bildung des NO-Adduktes führen. Hierfür würde auch der in Abbildung 4.18 erkennbare weitere langsame Anstieg der Messkurve nach etwa 10 minütiger Reaktionszeit sprechen. Eine andere Möglichkeit ist, dass eventuell vorliegende Verunreinigungen des Fängers zur unvollständigen Reaktion führten.

Das Anregungsspektrum von **11-NOH** zeigt zwei Peaks, welche beide ein identisches Emissionsspektrum liefern. Es besteht lediglich ein Unterschied in der

Fluoreszenzintensität, je nach dem, ob bei  $\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$  oder bei  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$  angeregt wird. Da der Unterschied nur 1600 Einheiten der relativen Fluoreszenzintensität beträgt, kann für biologische Anwendungen die höhere Anregungswellenlänge verwendet werden, da hier noch eine ausreichend hohe Fluoreszenzintensität beobachtet wird.

### 4.3 Zusammenfassung

Die zunächst angestrebte Synthese eines o-Chinodimethans mit Triphenylen als Fluorophor wurde in der 3. Reaktionsstufe (Bildung von **14** durch Decarbonylierung und Abspaltung von Chlor) eingestellt, da sich zeigte, dass die entstandenen Mengen an **14** sehr gering waren. Ausserdem umfasst die sich hieran anschliessende Synthese bis zum o-Chinodimethan-Derivat **19** weitere vier Stufen, wovon nur zwei in der Literatur<sup>[72]</sup> beschrieben sind. Dies stellte den weiteren Erfolg der Synthese und den ökonomischen Einsatz in Frage.

Da ein begrenzter synthetischer Aufwand ein wichtiges Kriterium für eine breit anwendbare Marker-Verbindung ist, sodass sie für umfangreiche Messungen in genügender Menge zur Verfügung steht, lohnt sich die aufwändige Synthese eines o-Chinodimethanderivates mit Triphenylen als Fluorophor nicht. Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass dieser Marker hinsichtlich seiner Wasserlöslichkeit grössere Schwierigkeiten bereitet als ein Phenanthrenderivat, das auf Grund seiner geringeren Molekülgrösse eine kleinere hydrophobe Gruppe beinhaltet. So hätten hier unter Umständen weitere mehrstufige Reaktionen zur Modifizierung des Moleküls mit hydrophilen Substituenten erfolgen müssen, um es überhaupt für Fluoreszenzmessungen verwenden zu können.

Das als Alternative synthetisierte o-Chinodimethan mit in 4-Position substituiertem Phenanthrengerüst **11** konnte dargestellt werden. Jedoch erweist sich diese Synthese bisher als komplexer als die des existierenden Markers **7**. Die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften von **11** sind denen des Moleküls **7** sehr ähnlich. Insbesondere die Emissionsspektren der Ketone **6** ( $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$  und **35** ( $\lambda_{\text{exc}} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ ) stimmen gut überein. Lediglich



die Fluoreszenzintensität von **35** ist um etwa einen Faktor 2 geringer als die Fluoreszenzintensität von **6**. Als nachteilig könnte sich die konzentrationsabhängige, bathochrome Verschiebung der maximalen Anregungswellenlänge von **35** erweisen, die in jedem Fall bei der Fluoreszenzmessung beachtet werden muss.

Der Abfang von NO durch FNOCT **11** im Vergleich mit FNOCT **7** konnte untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Reaktion von **11** zum Nitroxid **11-NO** oder die nachfolgende Reduktion zu **11-NOH** anscheinend langsamer verläuft als der Abfang von NO durch **7**. Dies sollte ebenfalls beim fluoreszenzspektroskopischen NO-Nachweis mit diesem Molekül beachtet werden.

Als Vorteil des neuen Farbstoffs könnten sich die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften des Reaktionsproduktes **11-NOH** erweisen, da dieses die Möglichkeit einer längerwelligen Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$  mit einer Emission bei  $\lambda_{\text{em}} = 471 \text{ nm}$  bietet. Die Fluoreszenzintensität bei dieser Anregungswellenlänge ist nur um ca. 1600 Einheiten geringer als bei Anregung im Maximum bei 315 nm. So könnte sich das neue FNOCT-System **11** gerade für Messungen an biologischen Systemen gut eignen, da die Gesamtfluoreszenzintensität ihres Hydroxylamins **11-NOH** zwar schwächer ist, die Intensität bei  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$  aber mit etwa 10.000 Einheiten noch um 3.000 Einheiten über der des Hydroxylamins **7-NOH** bei  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$  liegt. Damit müssten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zwar mit etwas energiereicherem Licht bestrahlt werden, das NO-Addukt würde aber eine intensivere Fluoreszenz liefern. Somit könnte sich herausstellen, dass FNOCT **11** seinen Einsatz vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie finden könnte.

## 5 Eigenschaften und Anwendung von FNOCT 7

In Hinblick auf die Anwendung des optimierten o-Chinodimethan-Systems FNOCT 7 mussten zunächst seine Eigenschaften weiter eingehend untersucht werden. Aufbauend auf der Literatur<sup>[20,63]</sup> wurden die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften untersucht. Spezifitäts- und Lagertests lieferten weitere für die Anwendung der Verbindung wichtige Informationen. Ein Toxizitätstest an unterschiedlichen Zelltypen ergänzte die Untersuchungsreihe.

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen umfassten die Untersuchung der Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren von FNOCT 7, seiner Keton-Vorstufe 6 und dem Umsetzungsprodukt mit NO, 7-NOH. Eine neue und nützliche Anwendung des Fluoreszenzmarkers konnte in der kinetischen Untersuchung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung durch NONOate gefunden werden. Hier konnte direkt die NO-Bildung in der Probe verfolgt werden. Zudem konnten aus dem Vergleich der Kinetiken Rückschlüsse auf den Verbleib des Stickstoffmonoxids, z.B. durch Reaktion mit anderen Komponenten der Messlösung, gezogen werden. Einleiten soll diesen Abschnitt ein kurzer Überblick über die Fluoreszenzspektroskopie.

### 5.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde um 1850 als Forschungsgebiet begründet, als G.G. STOKES die Veränderung der Wellenlänge bei der Fluoreszenz im Gegensatz zur Lichtstreuung erkannte und dieses Phänomen, die sogenannte „STOKES-Verschiebung“, untersuchte<sup>[79]</sup>. Seit dieser Zeit findet die Fluoreszenzspektroskopie organischer Verbindungen ihre Anwendung als Analysenmethode. Vorteile der Methode sind vor allem ihre hohe Empfindlichkeit und die gute Spezifität. Es können noch Konzentrationen im ppb (parts per billion) –Bereich erfasst werden. Ausserdem sind die Proben keinerlei thermischer Belastung ausgesetzt. Diese Vorteile verhelfen der Fluoreszenzspektroskopie zu einer Vielzahl von Anwendungen, insbesondere im

klinischen, biochemischen und biomedizinischen Bereich. Aber auch bei Analysen anorganischer Substanzen hat sich die Methode als sehr nützlich erwiesen. Als nachteilig kann sich bei lichtsensitiven Proben eine längere Bestrahlung insbesondere bei kurzen Wellenlängen auswirken<sup>[80]</sup>. Dies ist vor allem bei der Aufnahme von Langzeit-Kinetiken zu beachten. Auch trübe Proben, zu hohe Viskosität oder Löscheffekte limitieren den Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie<sup>[80]</sup>.

Unter dem Begriff der Lumineszenz versteht man Strahlungserscheinungen, die bei verschiedenen Stoffen nach einer vorangegangenen Anregung ohne Abgabe thermischer Energie auftreten. Nach Art der Energiezufuhr werden unterschiedliche Lumineszenzprozesse unterschieden. Hierzu zählt auch die Photolumineszenz. Die Energie wird hier durch Absorption von Licht mit Wellenlängen zwischen 250 und 800 nm zugeführt. Photolumineszenz kann je nach Abstrahlungsdauer und Lebensdauer der Abstrahlung nach Abschalten der Anregungsstrahlung (Abklingzeit) in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden werden. Bei der Fluoreszenz wird die Emissionsstrahlung zwischen 0.1 bis 100 ns nach Anregung abgegeben und besitzt sehr kurze Abklingzeiten. Als Phosphoreszenz bezeichnet man die Emission, wenn der Abstrahlungsvorgang frühestens nach 1 ms beginnt. Die Abklingzeiten betragen hier 0.1  $\mu$ s bis zu 100 s und länger<sup>[81]</sup>. Dies ist auf unterschiedliche elektronische Vorgänge nach Anregung eines Moleküls zurückzuführen.

Bestrahlt man ein Molekül mit geschlossener Elektronenschale mit Licht geeigneter Wellenlänge, so wechselwirken die Photonen mit den Elektronen des Moleküls. Dies führt unter Einhaltung des Franck-Condon-Prinzips zur Anregung der Elektronen aus dem Singulett-Grundzustand ( $S_0$ ) in höhere Schwingungszustände der angeregten Elektronenzustände ( $S_1$ ,  $S_2$ ...). Dabei müssen nicht zwangsläufig nur Übergänge vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand stattfinden. Auch höhere Singulett-Zustände (z.B.  $S_3$  oder  $S_4$ ) können erreicht werden. Für komplexe Moleküle kann sich so ein kompliziertes (bandenreiches) Anregungsspektrum ergeben, wobei das Emissionsspektrum einfach (eine oder wenige Banden) sein kann<sup>[82]</sup>. Durch Wechselwirkung mit umgebenden Molekülen kann das angeregte Molekül Schwingungsenergie verlieren. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als strahlungslosen Zerfall. Es geht so in den elektronisch angeregten Schwingungsgrundzustand über. Durch Emission von Licht kann es dann in den elektronischen Grundzustand

gelangen. Zur Veranschaulichung der Fluoreszenz ist in Abbildung 5.1-1 das Jablonski-Energiediagramm eines hypothetischen Moleküls und daraus abgeleitet das Absorptions- und Emissionsspektrum wiedergegeben.

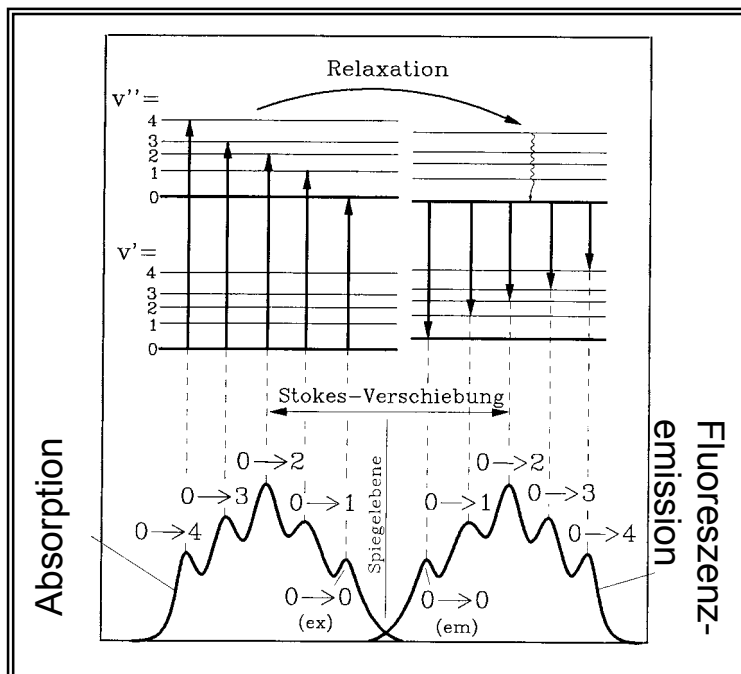


Abb. 5.1: Schematische Herleitung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren aus einem Jablonski-Energiediagramm. Die Schwingungsniveaus liegen für verschiedene elektronische Zustände ähnlich und erklären so den Spiegelcharakter beider Spektren. Die elektronischen Zustände  $S_0$  und  $S_1$  liegen in Abhängigkeit der Übergangsrichtung unterschiedlich „hoch“, weshalb der Spiegelcharakter nur angenähert erreicht wird. Die STOKES-Verschiebung ist eingezeichnet<sup>[83]</sup>.

Da sich fluoreszenzspektroskopische und –mikroskopische Methoden insbesondere für biologische und biochemische Anwendungen eignen, kann das FNOCT-System zur Problemlösung in diesen Bereichen sehr gut angewendet werden.

## 5.2 Eigenschaften des Fluoreszenzmarkers FNOCT

### 5.2.1 Reaktion mit Stickstoffmonoxid

Das FNOCT-Molekül **7** reagiert mit Stickstoffmonoxid, indem zunächst ein Nitroxid **7-NO** gebildet wird, welches dann in Gegenwart geeigneter Reduktionsmittel zu einem Hydroxylamin **7-NOH** reduziert wird. Die Reaktion ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

Sowohl das zunächst gebildete Nitroxid **7-NO**, als auch das Hydroxylamin **7-NOH** sind fluoreszenzfähige Spezies. Da freie Radikale, insbesondere Nitroxid-Radikale typische Fluoreszenzlöcher sind, wird aufgrund dieses „Selbstquenchungs-Effektes“ beim Radikal **7-NO** nicht die maximal mögliche Fluoreszenzintensität erreicht. Mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  erhält man ein Fluoreszenzspektrum maximaler Intensität bei  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$ . Dabei entspricht der Anstieg der Fluoreszenzintensität der Menge an abgefangenem NO. Es sei daran erinnert, dass FNOCT selbst eine deutlich schwächere Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$  zeigt.

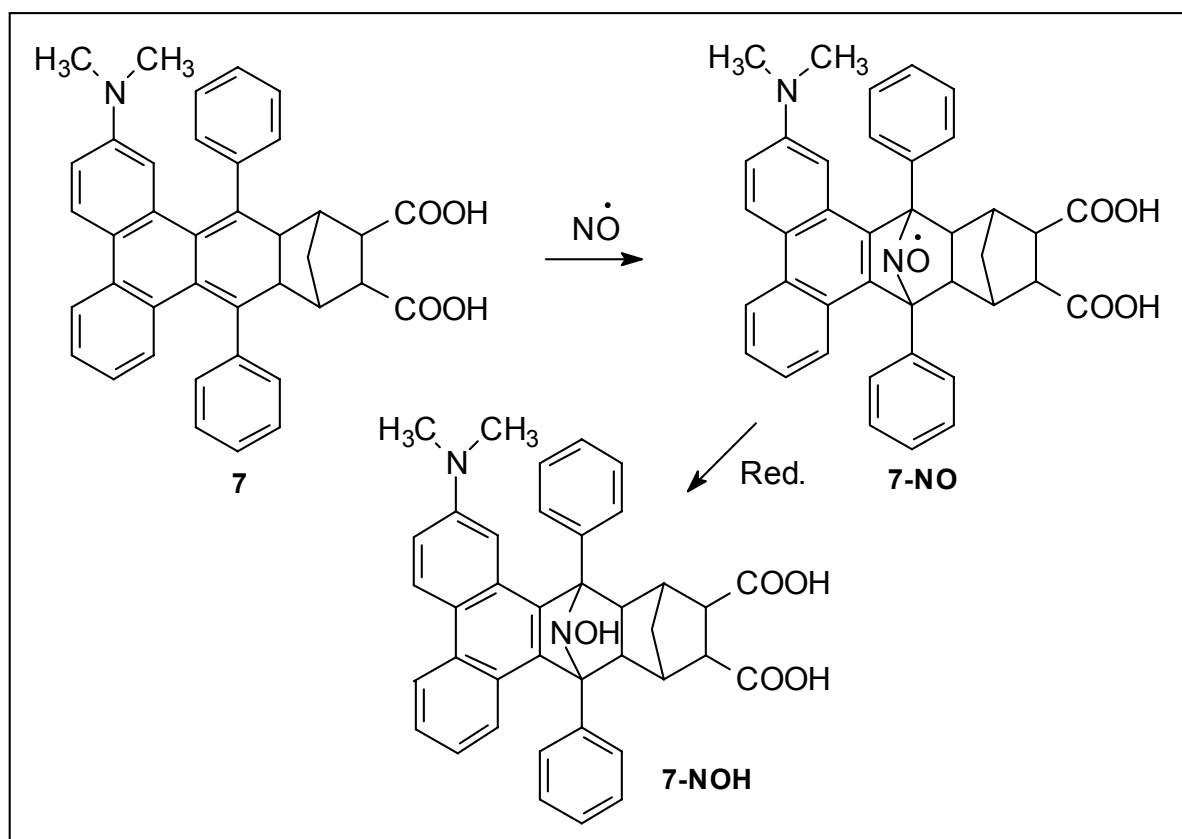


Abb. 5.2: Reaktion von FNOCT 7 mit NO und anschließende Reduktion des gebildeten Nitroxids **7-NO** zum Hydroxylamin **7-NOH**

In Anwendungen des FNOCT-Systems wurde die Reduktion des Nitroxids **7-NO** bislang immer unter Verwendung von Ascorbinsäure durchgeführt. Wie weiter unten (Kap. 5.3) noch erläutert wird, sollte dieses Reduktionsmittel nicht für alle Untersuchungen verwendet werden.

### 5.2.2 Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren

Viele Eigenschaften des FNOCT-Moleküls **7**, seiner Vorstufe, des Ketons **6** und auch des reduzierten NO-Adduktes **7-NOH** wurden bereits in Arbeiten von P. MEINEKE<sup>[20,63]</sup> untersucht. Die Ergebnisse konnten hier überwiegend reproduziert werden. Eine Ausnahme bilden die Fluoreszenzanregungsspektren der drei Verbindungen. Diese wurden in den Arbeiten<sup>[20,62,63]</sup> ohne den kurzwelligen Anteil des Anregungsspektrums dargestellt, um die Korrespondenz zwischen langwelliger Anregung und Emission deutlicher herauszustellen. Für die Fluoreszenzmikroskopie ist der langwellige Anteil der Anregung von grossem Vorteil, da es bei Bestrahlung mit energiereichem Licht schnell zum Zelltod kommen kann. So empfiehlt sich hier trotz der geringeren Fluoreszenzintensität die Einstrahlung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ , um den lichtbedingten Zellschaden möglichst zu begrenzen.

Die gemessenen Anregungsspektren können mit dem jeweils zugehörigen UV/Vis-Spektrum verglichen werden (Abbildung 5.3). Hierbei zeigt sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Messtechnik eine gute Übereinstimmung in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 400 nm. Unterhalb von 300 nm treten grössere Abweichungen zwischen UV/Vis- und Anregungsspektrum auf. Dies ist bedingt durch die im Fluoreszenzspektrometer verwendete Lichtquelle (Xenon-Lampe, 75 W), die bei Wellenlängen unter 300 nm noch nicht die volle Lichtintensität abgibt (Auskunft des Herstellers J&M und Literatur<sup>[84]</sup>). Dies führt dazu, dass man einen vermeintlichen Peak bei 320 nm (Hydroxylamin **7-NOH**) bzw. 340 nm (Keton **6**) detektiert, der im UV/Vis-Spektrum einer Schulter entspricht. Sehr ausgeprägt ist dieser Effekt beim Keton **6**, da man hier bei 332 nm einen Peak im UV/Vis-Spektrum findet. Der nachfolgende Anstieg kann mit dem Fluoreszenzspektrometer nicht mehr detektiert werden (vergl. Abbildung 5.3 Bild 1 und 2). Bei Fluorimetern<sup>a</sup> mit stärkeren Lampen (z.B. 150 W statt 75 W) befindet sich das Maximum der Anregungsspektren von Hydroxylamin und Keton bei ca. 290 nm.

---

<sup>a</sup> z.B. Fluorimeter der Firma Shimadzu Typ RF-1501 am Klinikum der Universität Essen.

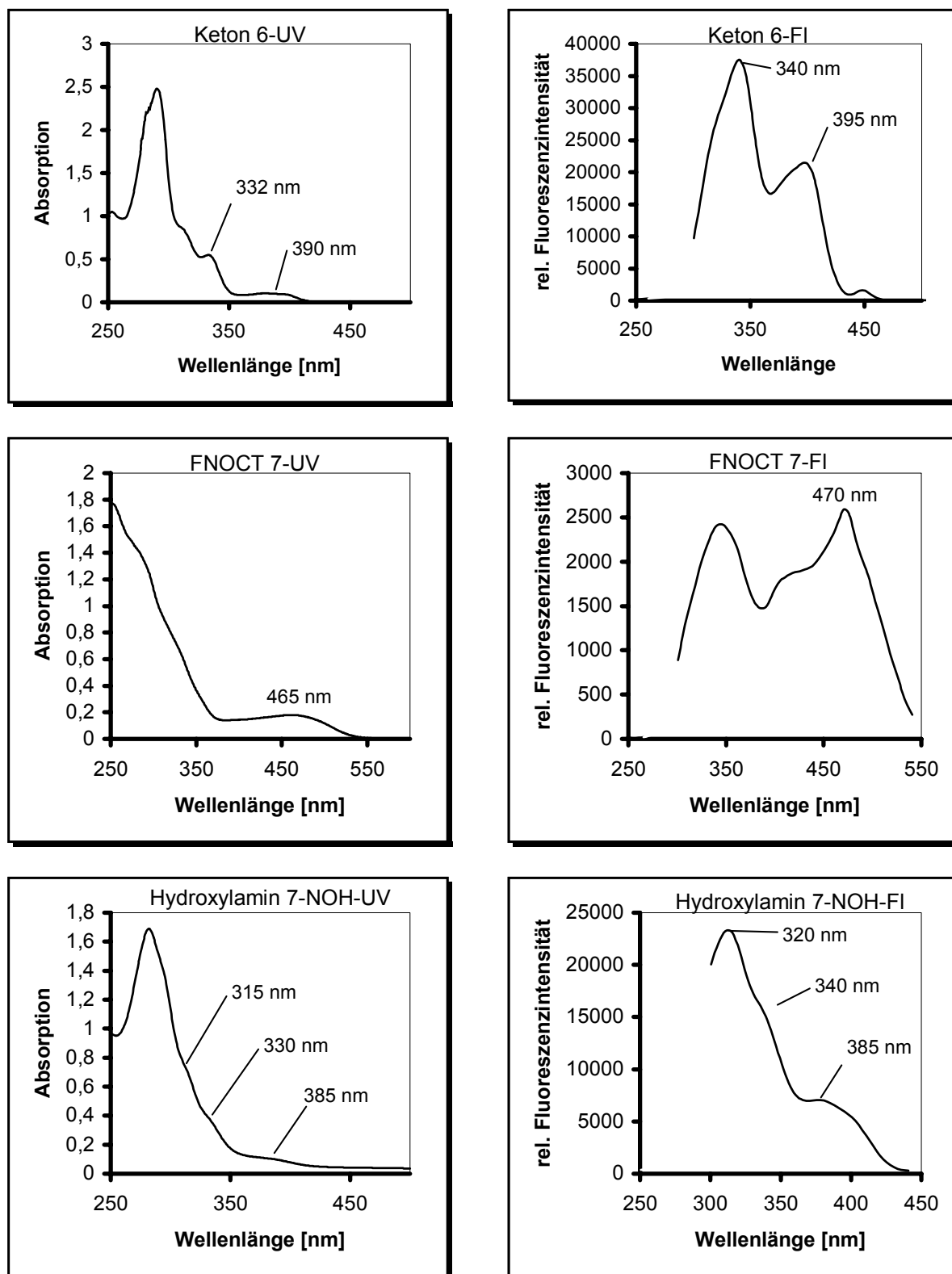


Abb. 5.3: Vergleich der unkorrigierten Anregungsspektren von Keton 6 (in THF), FNOCT 7 und Hydroxylamin 7-NOH (jeweils Phosphatpuffer pH = 7.25 mit 10 % Pluronic) mit den jeweiligen UV/Vis-Spektren (gleiche Lösungsmittel wie bei der Fluoreszenz). Konzentrationen bei beiden Aufnahmen je 50  $\mu\text{M}$  der Substanz.

Das Anregungsspektrum der Verbindung **7** ist bedingt durch die nicht ganz vollständige Photolyse (ca. 95 % nach NMR) mit dem Ausgangsstoff **6** verunreinigt, was man an der Bande bei 345 nm erkennen kann. Die Anregungsspektren wurden jeweils am Maximalpunkt ihres zugehörigen Emissionsspektrums detektiert.

Die Fluoreszenzemissionsspektren konnten, wie bei MEINEKE<sup>[20,62,63]</sup> beschrieben, reproduziert werden. Die Abbildungen 5.4 bis 5.6 zeigen die Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren der Verbindungen **6**, **7-NOH** und **7**.

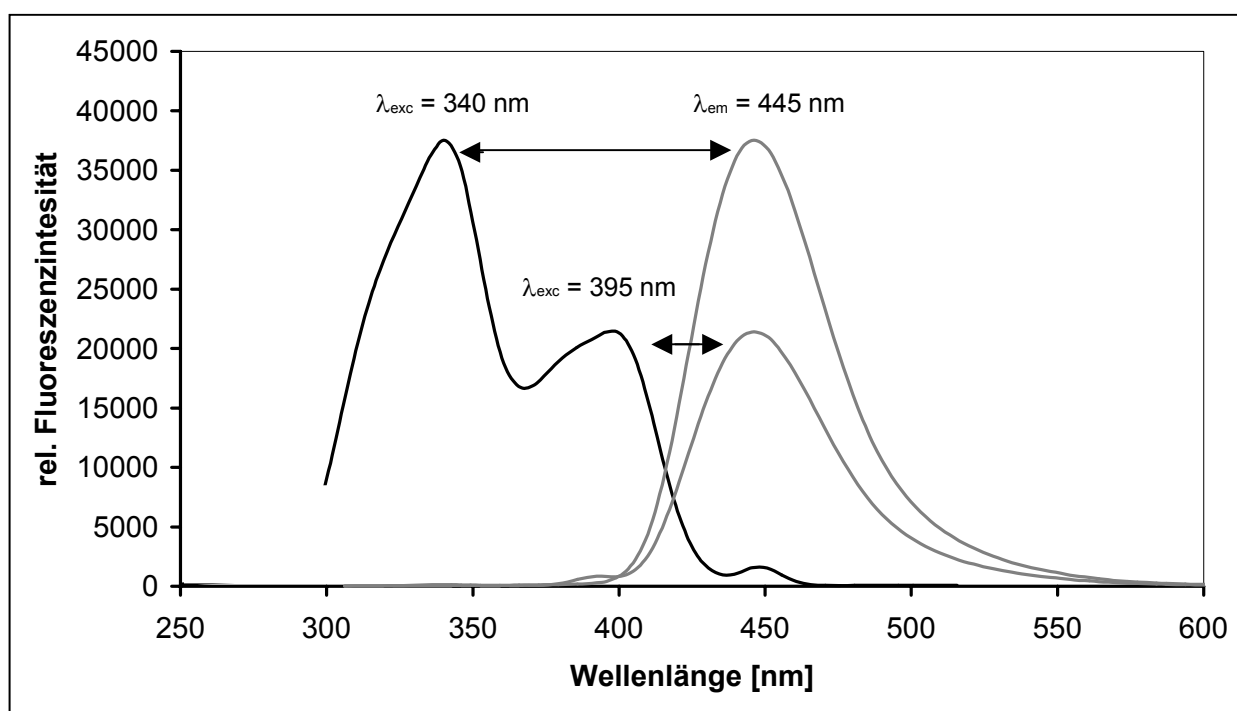


Abb. 5.4: Anregungs- und Emissionsfluoreszenzspektren des Ketons **6** (50  $\mu$ M in Tetrahydrofuran)

Bei Betrachtung der Fluoreszenzspektren von Keton **6** (Abb. 5.4) und Hydroxylamin **7-NOH** (Abb. 5.5) wird deutlich, dass das Emissionsspektrum lediglich eine Änderung der Fluoreszenzintensität erleidet, je nach dem, bei welchem Wellenlängenmaximum angeregt wird. Ansonsten werden keine Änderungen, z.B. eine Verschiebung des Maximums zu anderen Wellenlängen oder die Bildung neuer Banden beobachtet. Somit sind Messungen mit Anregung bei beiden Maxima z. B. bei Verbindung **7-NOH** bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320$  nm und bei  $\lambda_{\text{exc}} = 380$  nm möglich.



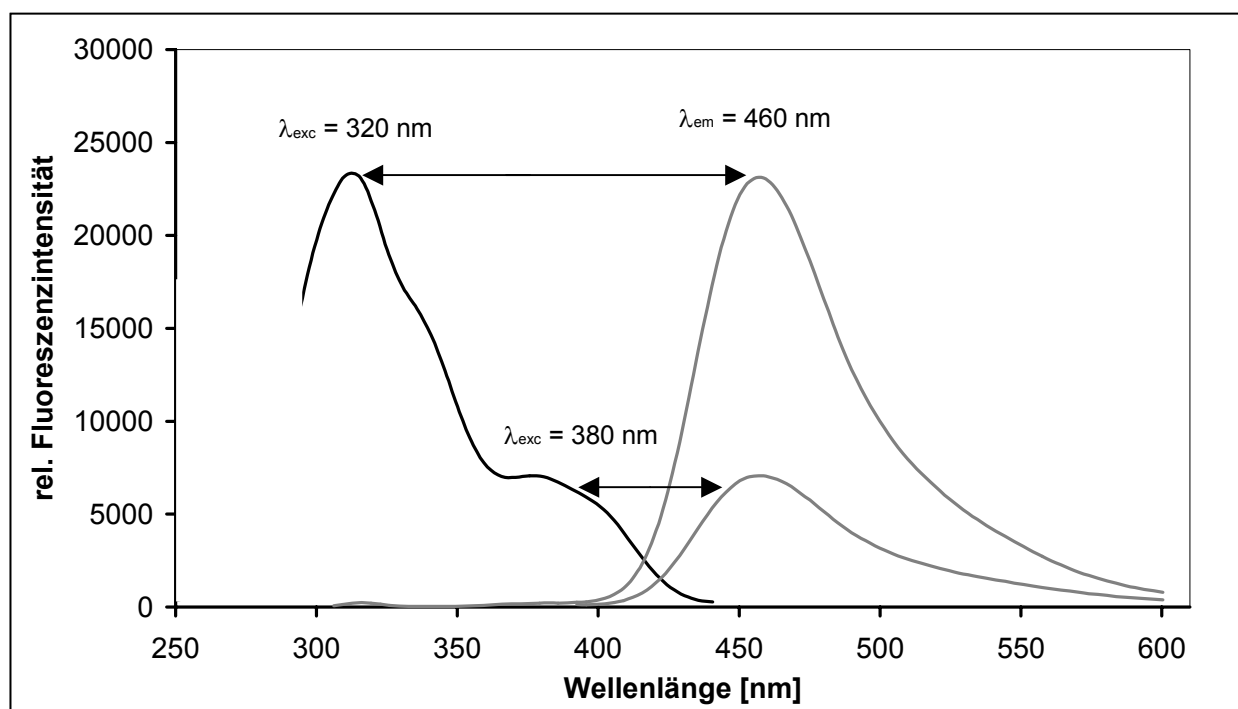


Abb. 5.5: Anregungs- und Emissionsfluoreszenzspektren des Hydroxylamins **7-NOH** (in Posphatpuffer pH = 7.25). Das Hydroxylamin wurde durch Zusatz eines Diazeniumdiolates (50  $\mu\text{M}$  MAHMA/NO) unter Ausschluss von Sauerstoff aus 50  $\mu\text{M}$  FNOCT in Lösung gebildet. Reduktionsmittel: 50  $\mu\text{M}$  Glutathion.

Das Emissionsspektrum des FNOCT **7** (Abb. 5.6) mit einer Anregung von  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$  verändert seine Form, wenn bei niedrigeren Wellenlängen (z. B.  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ , Anregungswellenlänge des Hydroxylamins **7-NOH**) angeregt wird (Abb. 5.7). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei  $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$  nur das o-chinoide System des Fängers **7** angeregt wird. Durch Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  wird zusätzlich das Phenanthrensystem des Ketons **6** mit erfasst. So sind dann im Emissionsspektrum von FNOCT **7** statt einem Peak bei  $\lambda_{\text{em}} = 583 \text{ nm}$  zwei Peaks bei  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$  zu sehen. Dieser Effekt beruht somit auf der oben genannten geringen Verunreinigung mit dem Ausgangsmolekül **6** bzw. gebildeten Zersetzungsprodukten, die ebenfalls den Phenanthrenfluorophor enthalten.

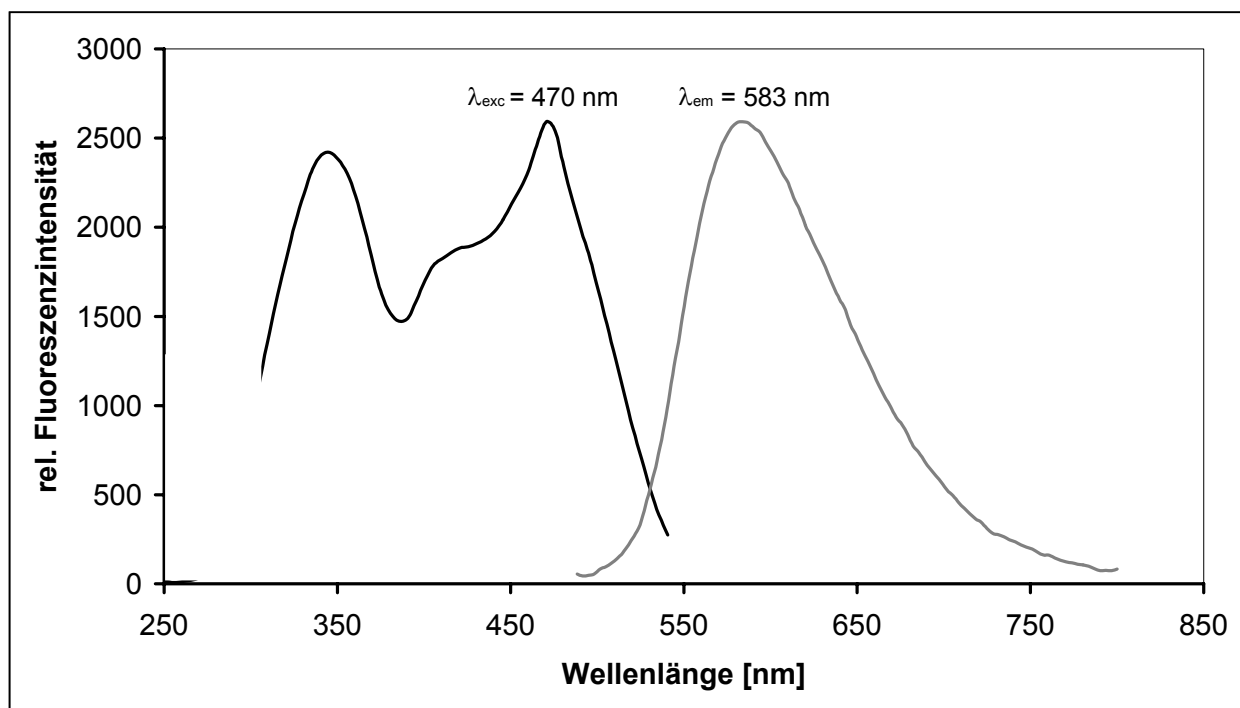


Abb. 5.6: Anregungs- und Emissionsfluoreszenzspektren des FNOCTs 7 (50  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer, pH = 7.25, Zusatz von 10% Pluronic).

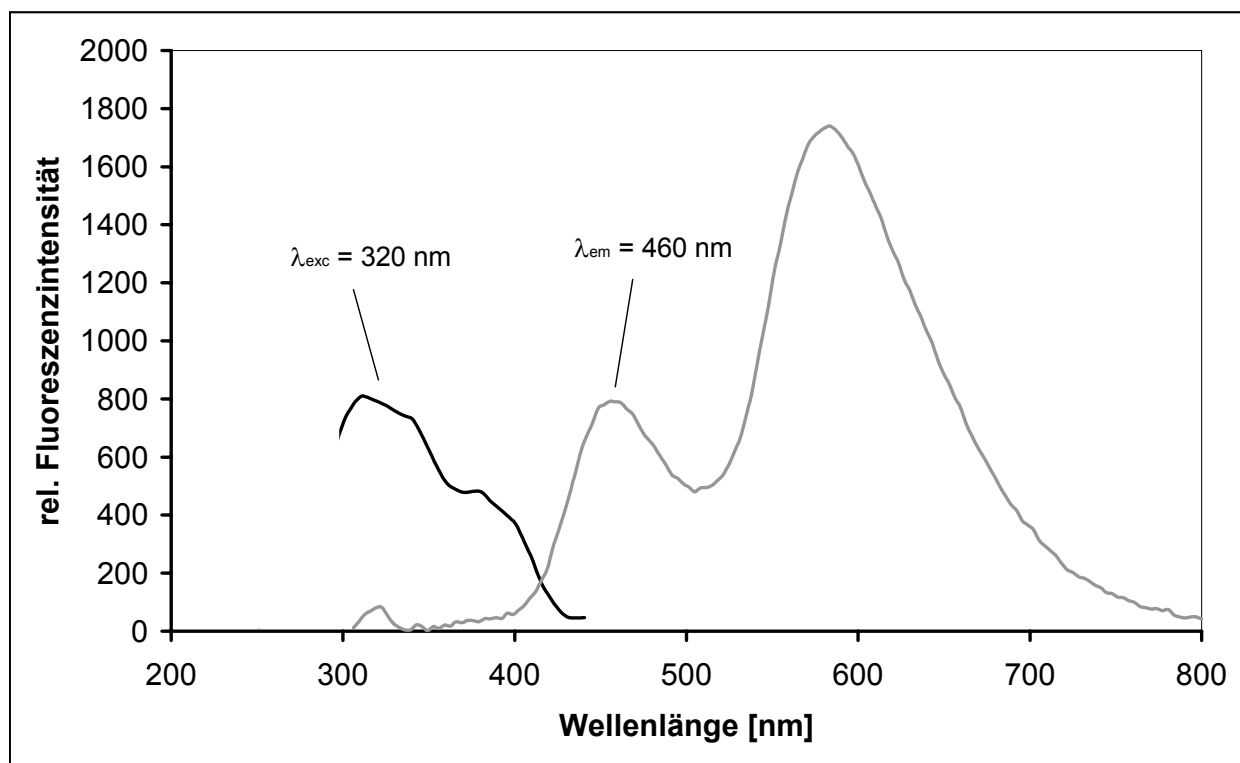


Abb. 5.7: Anregungs- und Emissionsfluoreszenzspektren des FNOCT 7. Bedingungen wie in Abb. 5.6, aufgenommen bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ .

Abbildung 5.7 zeigt, dass bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  das Anregungsspektrum des Ketons **6** mit dem Anregungsspektrum des FNOCT **7** überlagert ist. Man beachte, dass die Fluoreszenzintensität der Verunreinigung im Vergleich mit dem reinen Hydroxylamin (Abbildung 5.5) bei gleicher Ausgangskonzentration gering ist. Der im Fluoreszenz-Emissions-Spektrum erhaltene Wert bei  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$  (Anregung bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ) bildet somit die Grundfluoreszenz der jeweiligen Farbstoffcharge und sollte bei Anwendungen immer mit aufgenommen werden, um die gemessenen Spektren zu korrigieren. Diese Grundfluoreszenz ist naturgemäss abhängig vom Grad der Verunreinigung der Charge, bedingt durch den jeweiligen Umsatz bei der Photolyse und die mögliche Alterung des verwendeten Fängers, die mit einer Erhöhung der Grundfluoreszenz durch eventuell auftretende Zersetzungsprodukte einher gehen kann.

### 5.2.3 Spezifität des Nachweisreagenz

Die Spezifität des Stickstoffmonoxid-Nachweises durch o-Chinodimethane wurde bereits für einige reaktive Spezies von MEINEKE<sup>[63]</sup> und BÄTZ<sup>[71]</sup> untersucht. Hier wurde hauptsächlich die Reaktivität gegenüber Sauerstoffradikalen wie z.B.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  oder OH und  $\text{H}_2\text{O}_2$  u.a. untersucht. Dabei zeigte sich, dass keine dieser Spezies mit FNOCT zu fluoreszierenden Produkten reagierte. In der vorliegenden Arbeit wurde diesen Experimenten die Untersuchung der Reaktivität des Nitroxidanion ( $\text{NO}^-$ ) gegenüber dem o-Chinodimethan FNOCT **7** zugefügt. Das Nitroxidanion wurde hierbei aus Angelis Salz ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) durch Zerfall in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.24$ ) freigesetzt. Mittels FNOCT **7** wurde in einem kinetischen Experiment unter Ausschluss von Sauerstoff und ohne Zusatz von Reduktionsmitteln ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet. Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass FNOCT **7** auch mit  $\text{NO}^-$  reagiert und direkt (nach Protonierung) das Hydroxylamin FNOCT-NOH bildet. Da sich hieraus aber zusätzlich interessante Anwendungsmöglichkeiten des FNOCT-Systems in Bezug auf die Aufklärung des Zerfallsmechanismus von Angelis Salz ergaben, werden diese Untersuchungen im Kapitel 5.3.4 im Detail aufgeführt.

### 5.2.4 Wirkung des Lösungsmittels

Alle Substanzen **6**, **7** und **7-NOH** sind in Tetrahydrofuran gut löslich. Für die fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung ist dies somit ein geeignetes Lösungsmittel. Sollen jedoch Untersuchungen an NO-Donatoren vorgenommen werden, treten in organischen Lösungsmitteln Schwierigkeiten auf, weil die meisten Donatoren, wie z. B. die Diazeniumdiolate in organischen Lösungsmitteln unlöslich sind. So wurde ein Phosphatpuffer<sup>[85]</sup> definierten pH-Wertes (pH = 7.24) für die Experimente verwendet, was im allgemeinen auch dem pH-Wert eines physiologischen Mediums entspricht. Durch den Wechsel des Lösungsmittels traten Probleme, bedingt durch die unterschiedliche Löslichkeit der einzelnen Komponenten bei gleicher Konzentration in wässriger Lösung, auf. Es wurden Konzentrationen von 50 µM verwendet, da dies die in biologischen Systemen am besten geeignete Konzentration für fluoreszenzspektroskopische und -mikroskopische Messungen ist.<sup>[63]</sup> Das Keton **7** ist in reinem Phosphatpuffer am schwersten löslich. Es werden nur trübe Lösungen erhalten, die für fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen ungeeignet sind. Das FNOCT-Molekül **7** kann gelöst werden, bildet aber kleine Konglomerate, die vor allem bei der Untersuchung lebender Zellen unter dem Mikroskop sehr hinderlich sind, da keine einheitliche Verteilung des Farbstoffes stattfindet. Erkennbar ist die schlechte Löslichkeit auch immer an grossen Streulichtpeaks im Emissions- und Anregungsfluoreszenzspektrum. Das Hydroxylamin **7-NOH** ist besser löslich als FNOCT **7**, was zu einer höheren Fluoreszenzintensität dieses Moleküls führt. Dies ist wahrscheinlich auf die polare NOH-Gruppe zurückzuführen.

Bessere Löslichkeiten der Moleküle kann man durch Zugabe eines Lösungsvermittlers erreichen. Als geeignete Verbindung<sup>[63]</sup> hat sich hier Pluronic F127 erwiesen.

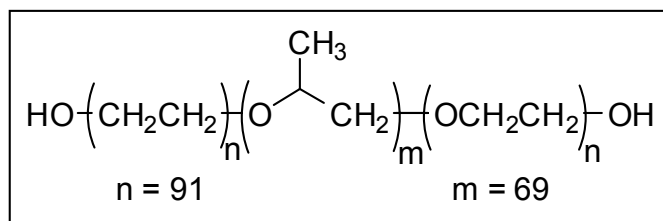


Abb. 5.8: Der Lösungsvermittler Pluronic F127.

Untersuchungen, welche Menge an Pluronic am besten für die Messungen geeignet ist, ergaben, dass die Verbindung einen Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum des FNOCT 7 hat. Der Effekt wirkt sich dabei vor allem auf das Emissionsspektrum des FNOCT aus. Abbildung 5.9 zeigt die Fluoreszenzspektren des FNOCT 7 bei Zugabe von Pluronic F127 und ohne Zusatz dieser Verbindung.

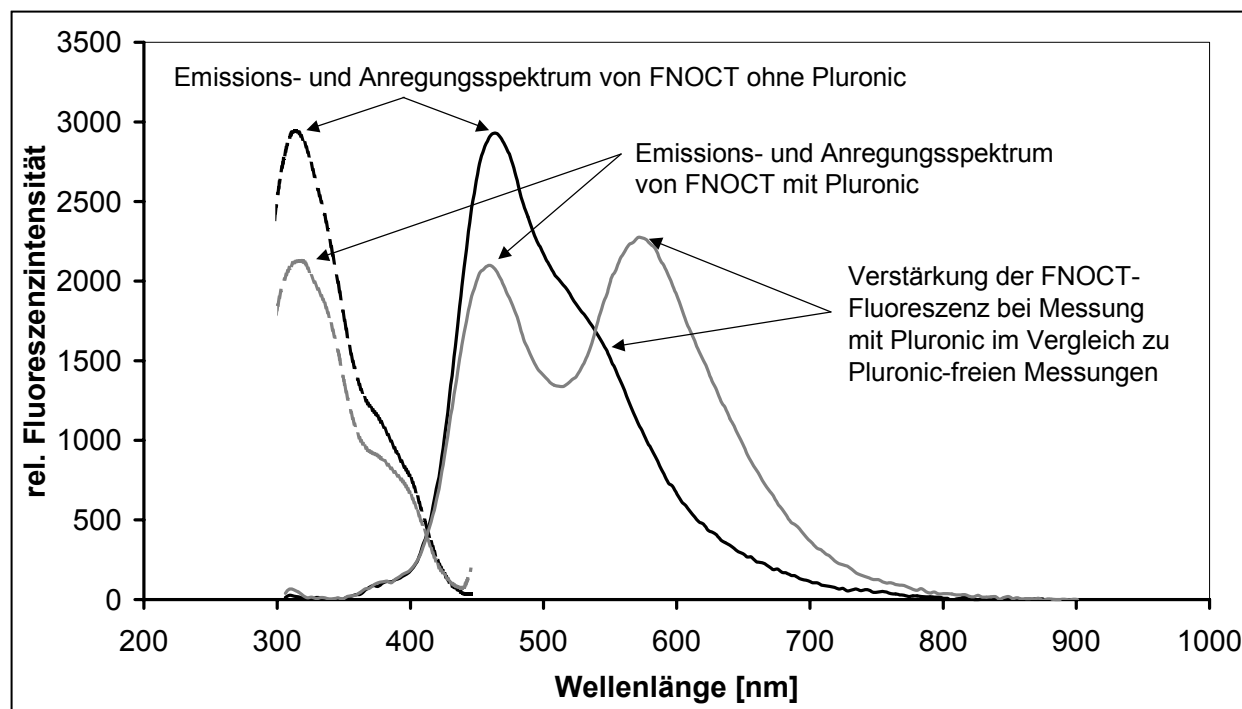


Abb. 5.9: Vergleich der Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren von FNOCT 7 (je 50  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.24$ ), aufgenommen bei  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$  ohne Pluronic und unter Zusatz von Pluronic. Die durch die schlechte Löslichkeit entstandenden Streulichtpeaks der Anregungsspektren bei  $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$  wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit abgebildet.

Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn einem Ansatz mit 50  $\mu\text{M}$  FNOCT in 1000  $\mu\text{L}$  Puffer 5  $\mu\text{L}$  Pluronic F127 (10 %) zugesetzt wurden. Wird mehr Pluronic verwendet, hat dies kaum mehr Auswirkungen auf das Emissionsspektrum des FNOCT. Durch die Zugabe von Pluronic wird auch eine geringfügige Verschiebung des Maximums bei  $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$  zu kleineren Wellenlängen erreicht, was wahrscheinlich auf die Veränderung der Lösungsmittelpolarität zurückgeführt werden kann. Das Anregungsspektrum wird nur hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von Pluronic beeinflusst.

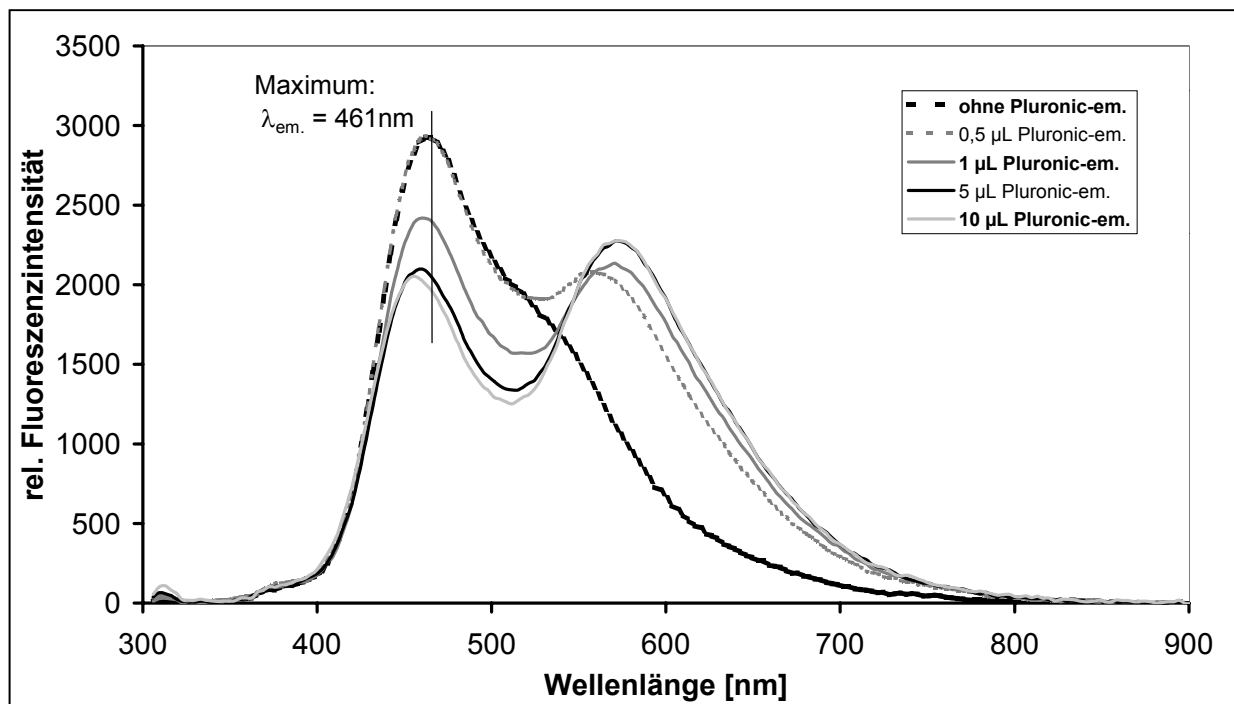


Abb. 5.10: Vergleich der Veränderung der Emissionsfluoreszenzspektren von FNOCT 7 50  $\mu\text{M}$  in 1000  $\mu\text{L}$  Puffer ( $\lambda_{exc} = 320\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 460\text{ nm}$ ) bei Zugabe unterschiedlicher Mengen an Pluronic F127. Bei  $\lambda_{em} = 460\text{ nm}$  werden Reste des Ketons, die als Verunreinigung im Farbstoff enthalten sind, detektiert.

Das Keton **6** kann auch durch Zugabe von Pluronic oder grösserer Mengen an Dimethylsulfoxid (DMSO) nur schlecht in Puffer gelöst werden. Dies ist im allgemeinen auch nicht notwendig, da die Verbindung nur für die Aufnahme von Referenzspektren von Interesse ist.

## 5.2.5 Lagerstabilität

Im Zuge der Anwendung von FNOCT 7 in biologischen und chemischen Systemen wurde auch die Langzeitstabilität der Verbindung untersucht. Dies ist wichtig im Hinblick auf Probenversendungen und für Langzeit-Experimente. Zunächst wurde die Stabilität des Feststoffes untersucht. Hierbei wurde gefunden, dass eine Lagerung von 7 Tagen bei Raumtemperatur (ca. 23°C) unter Schutzgas der Substanz keinen Schaden zufügt. Kontrollen erfolgten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, indem die Probe im NMR-Röhrchen nach Abschluss der Lagerungszeit mit deuteriertem Tetrahydrofuran versetzt und gemessen wurde. Um die Substanz über einen

längeren Zeitraum ohne Qualitätsverluste aufzubewahren, empfiehlt sich die Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$ , besser noch auf Trockeneis bei  $-78^{\circ}\text{C}$  und unter Sauerstoffausschluss. Unter diesen Bedingungen war FNOCT **7** nach über 3 Jahren noch stabil.

Lösungen des FNOCTs **7** z. B. in DMSO als Stammlösung sollten nicht länger als 1-2 Tage verwendet werden. Andernfalls ist im Fluoreszenzspektrum ein leichter Anstieg der Hintergrundfluoreszenz zu erkennen. Wurden die Lösungen nach Entnahme eines Aliquots für eine Messung direkt bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren, konnte die Lösung ca. 3-4 Tage verwendet werden. Lösungen des Farbstoffes in Tetrahydrofuran waren nach ca. 12 h deutlich zersetzt und somit nicht mehr verwendbar. Messlösungen, auch in Puffer, sollten so kurz wie möglich vor der Messung angesetzt werden, jedoch waren die Qualitätsverluste nach 2 h noch nicht gravierend. Es war aber ein langsamer Anstieg der Grundfluoreszenz zu beobachten, der durch Einwirkung von Licht noch verstärkt wurde. Für mehrstündige Messungen unter intensiver Bestrahlung wurde ein Leerwert mitgeführt, um den Einfluss der Zersetzung des Farbstoffes zu dokumentieren. Dies kann für Messungen kleiner NO-Mengen und daraus resultierendem geringen Anstieg der Fluoreszenz von Interesse sein, um diesen vom Fluoreszenzanstieg durch Zersetzung abzugrenzen.

Auch das aus FNOCT **7** gebildete Hydroxylamin **7-NOH** wurde hinsichtlich seiner Stabilität in einer Messlösung untersucht. Wurde es zuvor vollständig gebildet, beobachtet man auch nach 2 Tagen noch keine Änderung der Fluoreszenz.

### 5.2.6 Untersuchung der Toxizität

Farbstoffe, die für biologische Systeme verwendet werden sollen, müssen zunächst auf ihre Toxizität hin getestet werden, da Systeme, die zum Zelltod führen, nicht für biologische Untersuchungen eingesetzt werden können. Um die Resistenz verschiedener Zellen auf den FNOCT-Farbstoff (**7** und **7e**) zu prüfen, wurde die LDH-Bestimmung eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der Bestimmung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand. LDH ist ein ubiquitäres Enzym, d. h. es kommt in jedem Zelltyp vor und ist für die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat und umgekehrt verantwortlich. Diese Reaktion ist in der Literatur<sup>[86]</sup> auch als letzter Schritt der anaeroben Glycolyse beschrieben.

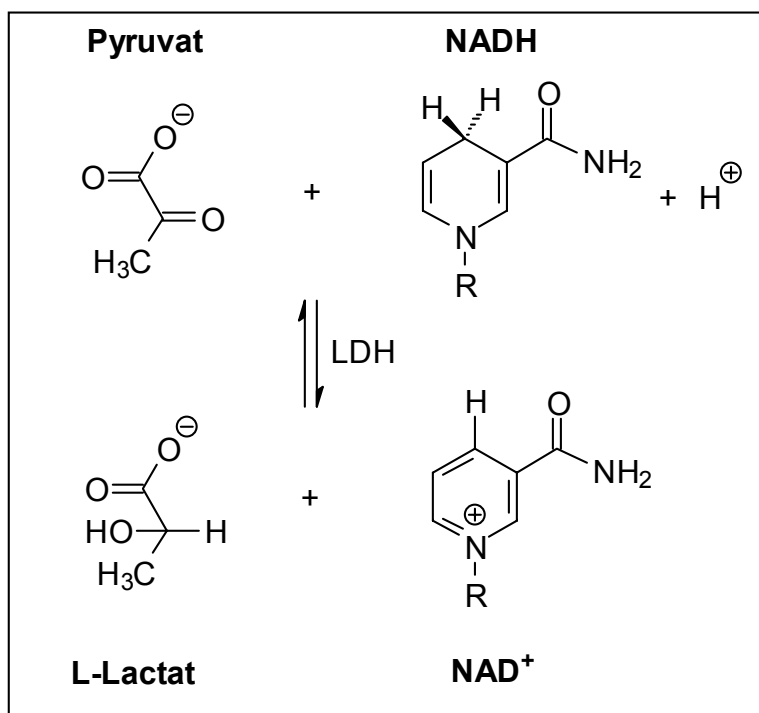


Abb.5.12: Durch LDH katalysierte Umsetzung von Pyruvat zu Lactat. Diese Reaktion ist die Grundlage der LDH-Bestimmung. Das Co-Enzym der Reaktion ist NADH, das zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt wird.

Die Bestimmung dieses Enzyms ist geeignet, um die Toxizität von Substanzen auf unterschiedliche Zelltypen zu ermitteln und zu vergleichen. Beim Zelluntergang kommt es durch Veränderungen der Membran zum Austritt cytosolischer Enzyme, zu denen auch LDH gehört. Bestimmt wird das Verhältnis der Aktivität des ausgetretenen Enzyms zur gesamten, also intra- und extrazellulären Enzym-Aktivität. Dieses Verhältnis kann nach JAUREGUI<sup>[87]</sup> als Vitalitätsparameter herangezogen werden.

Zur Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität wurde nach einer Stunde die erste, dann stündlich je eine weitere und nach sechs Stunden Inkubationszeit bei 37°C die letzte Probe des Zellüberstandes entnommen und untersucht. Hierzu macht man sich oben erwähnte LDH-katalysierte Umsetzung von Pyruvat, NADH und H<sup>+</sup> zu Lactat und NAD<sup>+</sup> zunutze. Dabei wird photometrisch die Abnahme von NADH über dessen spezifische Extinktion bei 334 nm bestimmt.



Um die Toxizität von FNOCT **7** und FNOCT/AM **7e** zu prüfen, wurden unterschiedliche Zelltypen und Zelllinien herangezogen. Als frisch präparierte Zellen standen Hepatocyten zur Verfügung. Weiterhin wurden L929-Fibroblasten, TIBS-Makrophagen und 3T3-Zellen mit den Farbstoffen inkubiert. Die Auswahl der Zellen erfolgte zum einen nach Verfügbarkeit, andererseits wurden Zelltypen gewählt, die von Interesse hinsichtlich der NO-Bildung waren (u.a. Makrophagen). Diese sollen beispielhaft aufgeführt werden, um den Verlauf der LDH-Aktivitätszunahme im Zellüberstand über einen Zeitraum von sechs Stunden zu dokumentieren. Dabei ist zu beachten, dass sich die TIBS-Makrophagen als der empfindlichste Zelltyp nach längerer Inkubationszeit erwiesen. Abbildung 5.13 zeigt die prozentuale Zunahme der LDH-Aktivität bei TIBS-Makrophagen mit dem Verlauf der Zeit.

Bei der Betrachtung von Abbildung 5.13 wird deutlich, dass die Makrophagen einen Zeitraum von 3 h unter allen gewählten Bedingungen gut überstehen. Nach ca. 3.5 h tritt bei einem Teil der Zellen Nekrose ein, was am Anstieg des LDH-Levels erkennbar ist. Nach 6 h sind über 50 % der Zellen, die mit FNOCT **7** versetzt worden waren und über 40 % der Zellen, die FNOCT/AM **7e** enthielten, tot. Jedoch auch der Vergleichswert, der nur Pluronic und DMSO enthält, zeigt einen Anstieg auf über 30 % nach 6 h. Im Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer) überleben ca. 85 % der Zellen über 6 h.

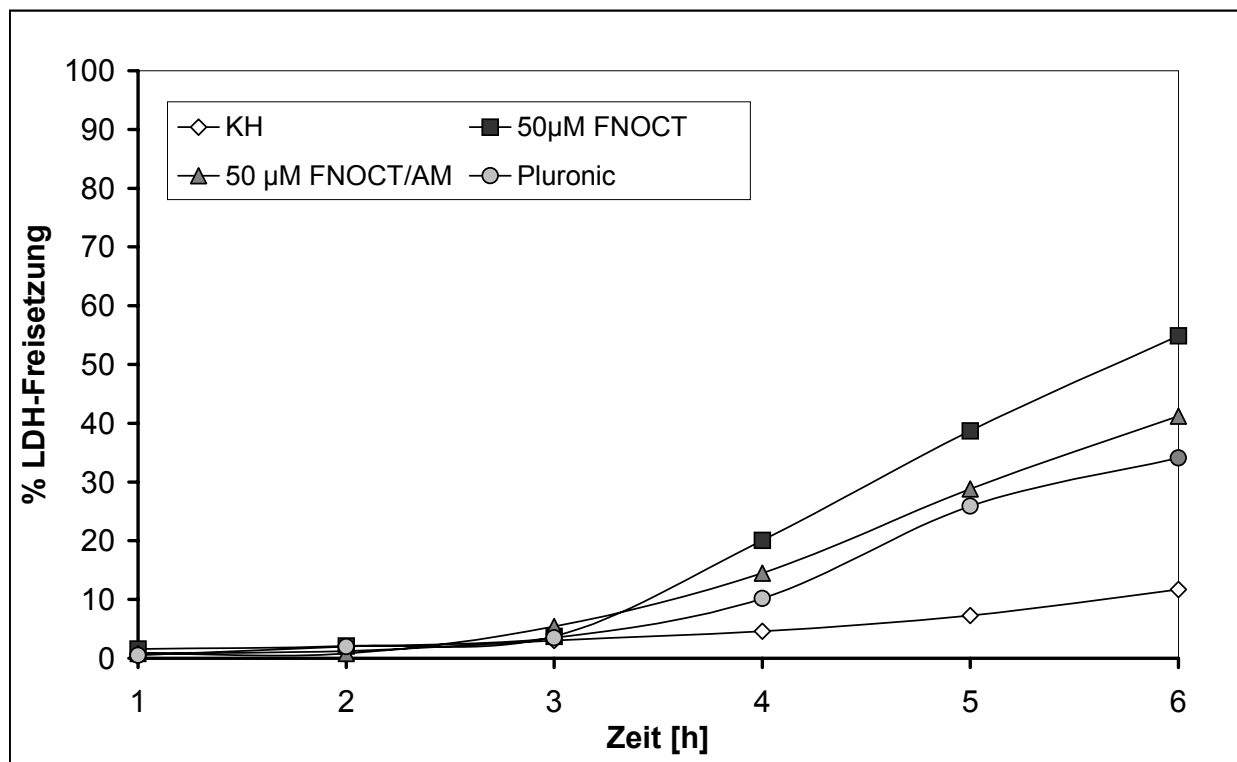


Abb. 5.13: Verfolgung der prozentualen LDH-Freisetzung mit der Zeit bei TIBS-Makrophagen. Jede Inkubation enthielt neben 50  $\mu\text{M}$  FNOCT 7 bzw FNOCT/AM 7e auch 60  $\mu\text{L}$  DMSO. Die Zusätze wurden in für die Fluoreszenzspektroskopie und –mikroskopie relevanten Mengen gewählt. 25  $\mu\text{L}$  Pluronic wurden als Lösungsvermittler zugesetzt.

Für die anderen untersuchten Zelltypen sind die Farbstoffe FNOCT 7 und FNOCT/AM 7e deutlich besser verträglich. Insbesondere die L929-Fibroblasten verhalten sich sehr resistent. Nach 6 h trat bei weniger als 5 % der Zellen Nekrose ein (Abbildung 5.14). Für die Fibroblasten wurde zusätzlich noch ein Vitalitätstest auf Mikroskopierplatten durchgeführt, da aufgrund anderer Experimente der Verdacht aufgekommen war, FNOCT/AM 7e verhalte sich zytotoxisch gegenüber den Fibroblasten. Es konnte aber gezeigt werden, dass eher das für jene Versuche gewählte Puffermedium (CBSS-Puffer) für diese Zellen unverträglich ist. In Krebs-Henseleit-Puffer ist die Überlebensrate sehr hoch. Fibroblasten, die normalerweise lang gestreckte Ausläufer haben und fest an der Zellkulturplatte aufgewachsen sind, zeigen bei Stresseinwirkung, wie z.B. schlecht verträglichem Kulturmedium, schnell morphologische Veränderungen (sog. Abkugeln) und lösen sich von der Kulturplatte ab. Auch dies ist ein Indiz dafür, ob ein Zusatz für diese Zellen toxisch ist. Bei der

mikroskopischen Betrachtung der mit FNOCT/AM **7e** beladenen Zellen fand man nur wenig morphologisch veränderte Zellen vor. Auch nach Zugabe des NO-Donors konnte durch die NO-Freisetzung kaum Zellschaden beobachtet werden. Eine Lösungsmittelkontrolle mit CBSS-Puffer wies jedoch nach 20 min schon viele abgekugelte, wenn auch noch lebende Zellen auf.

Abbildung 5.14 zeigt die prozentuale LDH-Freisetzung nach 6 h als Übersicht für alle untersuchten Zelltypen.

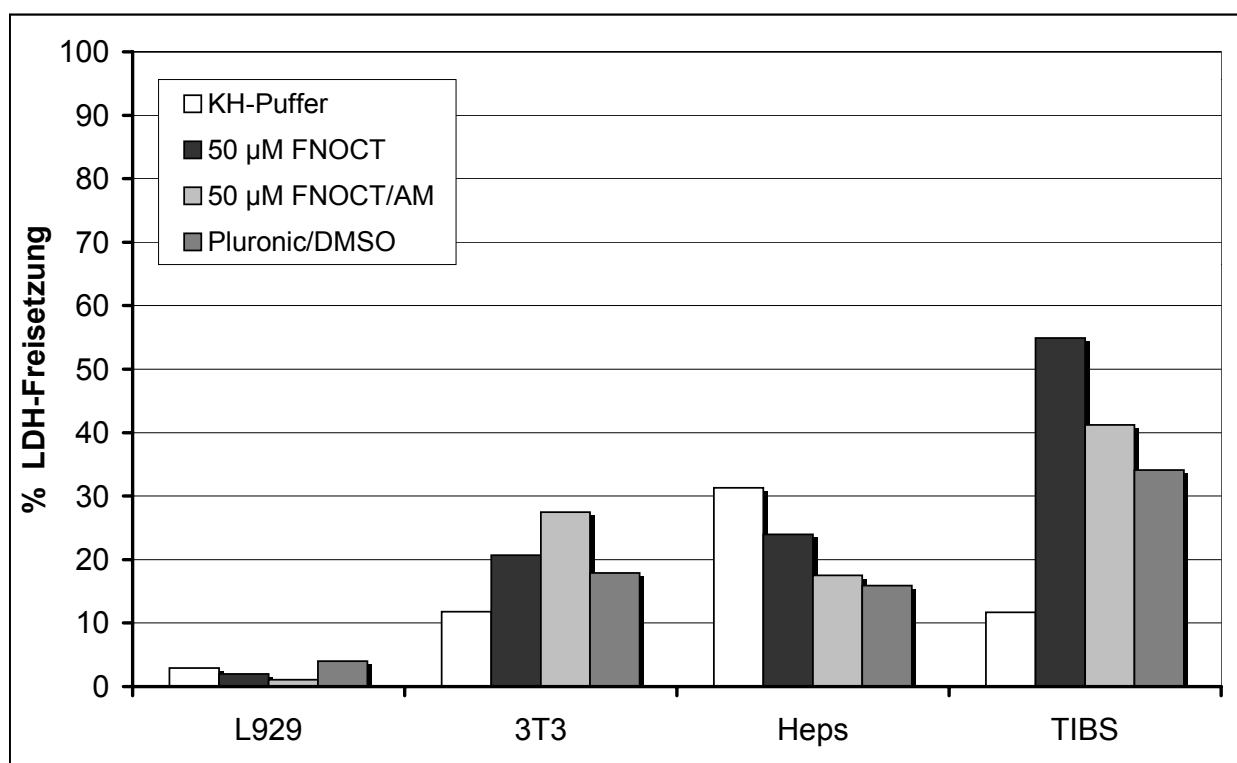


Abb.5.14: Beobachtung der prozentualen LDH-Freisetzung bei L929-Fibroblasten, 3T3-Zellen, Hepatocyten (Heps) und TIBS-Makrophagen nach 6 h Inkubationszeit. Fibroblasten zeigen eine sehr geringe, Makrophagen eine erhöhte Empfindlichkeit gegen FNOCT **7** und FNOCT/AM **7e**.

Insgesamt weisen die Farbstoffe FNOCT **7** und FNOCT/AM **7e** keine erhöhte Toxizität gegenüber dem Leerwert (KH-Puffer mit Pluronic und DMSO) für die verschiedenen Zelltypen auf. Dies wurde auch schon für die von P. MEINEKE<sup>[62,63]</sup> untersuchten Zelltypen festgestellt. Somit scheint das FNOCT-System für biologische Anwendungen gut geeignet zu sein.

### 5.3 Neuere Anwendungen der FNOCT-Methode

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte die Anwendung des FNOCT-Moleküls **7** zur Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften von NO-Donatoren sein. Die Zerfallskinetik dieser Verbindungen wurde bislang meist mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.<sup>[26,27,88]</sup> Gelegentlich findet auch die NO-Elektrode<sup>[18]</sup> ihren Einsatz bei solchen Messungen. Über die UV/Vis-Spektroskopie kann z. B. der Zerfall von Diazeniumdiolaten bei definierten Wellenlängen (meist um 250 nm)<sup>[101]</sup> verfolgt werden. Da aber nur die Absorption der Eduktmoleküle detektiert wird, kann nur indirekt die Stöchiometrie der NO-Freisetzung bestimmt werden. Auch kann man keine Aussage darüber machen, was nach der Bildung mit Stickstoffmonoxid geschieht, ob es z. B. mit anderen Komponenten der jeweiligen Messlösung reagiert. Mit der NO-Elektrode kann die stationäre Konzentration von NO gemessen werden, d. h. es kann ermittelt werden, wieviel NO sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Messlösung befindet. Vorteilhaft ist hierbei, dass man die Menge an freigesetztem NO über eine Kalibrierungskurve quantifizieren kann. Ein Nachteil ist, dass eine Erfassung der Gesamtmenge an NO nur durch lange Messzeiten und eine anschließende numerische Integration der Fläche unter der gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurve möglich ist.

Die FNOCT-Methode kann als komplementäre Methode hier von großem Nutzen sein, da die NO-Freisetzung direkt kinetisch verfolgt werden kann. Ausserdem erhält man unter geeigneten Bedingungen (z.B. Ausschluss von Sauerstoff) eine nahezu quantitative Aussage über die Gesamtmenge an NO, die in der Messlösung detektiert wird, da es sich um eine akkumulative Methode handelt.

Ein weiterer Vorteil der FNOCT-Methode ist, dass unter Umständen Aussagen über die Reaktivität des gebildeten Stickstoffmonoxids gegenüber möglichen Reaktionpartnern gemacht werden können. Reagiert z. B. eine Komponente einer Messlösung mit Stickstoffmonoxid, sollte dies zu Abweichungen von der beim Zerfall des NO-Donors in Abwesenheit dieser Komponente erwarteten Messkurve führen.

In den folgenden Abschnitten werden einige ausgewählte Möglichkeiten der Anwendung des FNOCT-Systems aufgeführt. Verwendet wurde für alle Messungen

FNOCT 7 (wird im weiteren Textverlauf nur als „FNOCT“ bezeichnet). Die im Folgenden angegebenen Messkurven wurden alle bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$  und einer Emission von  $\lambda_{\text{em}} = 458 \text{ nm}$  gemessen.

### 5.3.1 Allgemeine Untersuchungen zum Zerfall von N-Diazeniumdiolaten (NONOaten)

Der Zerfall von N-Diazeniumdiolaten ist eine interessante Anwendung für das FNOCT-System, weil diese NO-Donatoren ihren Einsatz als Medikamente finden könnten. N-Diazeniumdiolate sind in basischer Lösung oder als Feststoff (gekühlt) stabil, zersetzen sich jedoch thermisch in neutraler bis saurer Lösung oder durch Lichteinwirkung. Diese Faktoren beeinflussen auch die Halbwertszeit der unterschiedlichen N-Diazeniumdiolate. In dieser Arbeit wurden die kommerziell erhältlichen N-Diazeniumdiolate MAHMA/NO, PAPA/NO und Spermin/NO (Beschreibung siehe Kap. 1.1) für die Messungen mit dem FNOCT-System eingesetzt.

Die erste Experimentalserie umfasste Untersuchungen des Zerfalls von PAPA/NO in sauerstofffreier Pufferlösung ( $\text{pH} = 7.25$ ). Hier sollte bestimmt werden, welche Mengen an NO aus diesem N-Diazeniumdiolat freigesetzt werden und ob mit Hilfe der FNOCT-Methode Rückschlüsse auf die Halbwertszeit eines NONOates gezogen werden können.

In der Literatur<sup>[89]</sup> ist angegeben, dass ein Molekül PAPA/NO zwei Moleküle NO freisetzen kann. Daher sollten  $25 \mu\text{M}$  dieses NONOates bei Reaktion mit  $50 \mu\text{M}$  FNOCT dieses vollständig umsetzen und zur gleichen maximalen Fluoreszenzintensität führen wie  $50 \mu\text{M}$  PAPA/NO (d. h. 100%iger NO-Überschuss). Entsprechend sollte bei  $12.5 \mu\text{M}$  NONOat eine um die Hälfte reduzierte maximale Fluoreszenzintensität gefunden werden. Die Reaktion von FNOCT mit NO verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k_2 = 170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  <sup>[63]</sup> und ist damit keine extrem schnelle Reaktion. Somit muss gewährleistet sein, dass dem System hinreichend Zeit zur Reaktion bleibt, ohne dass mögliche Neben- oder Folgereaktionen zu einem Abbau von NO und/oder FNOCT-NO führen. Diese Vorüberlegungen konnten durch die Messungen bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

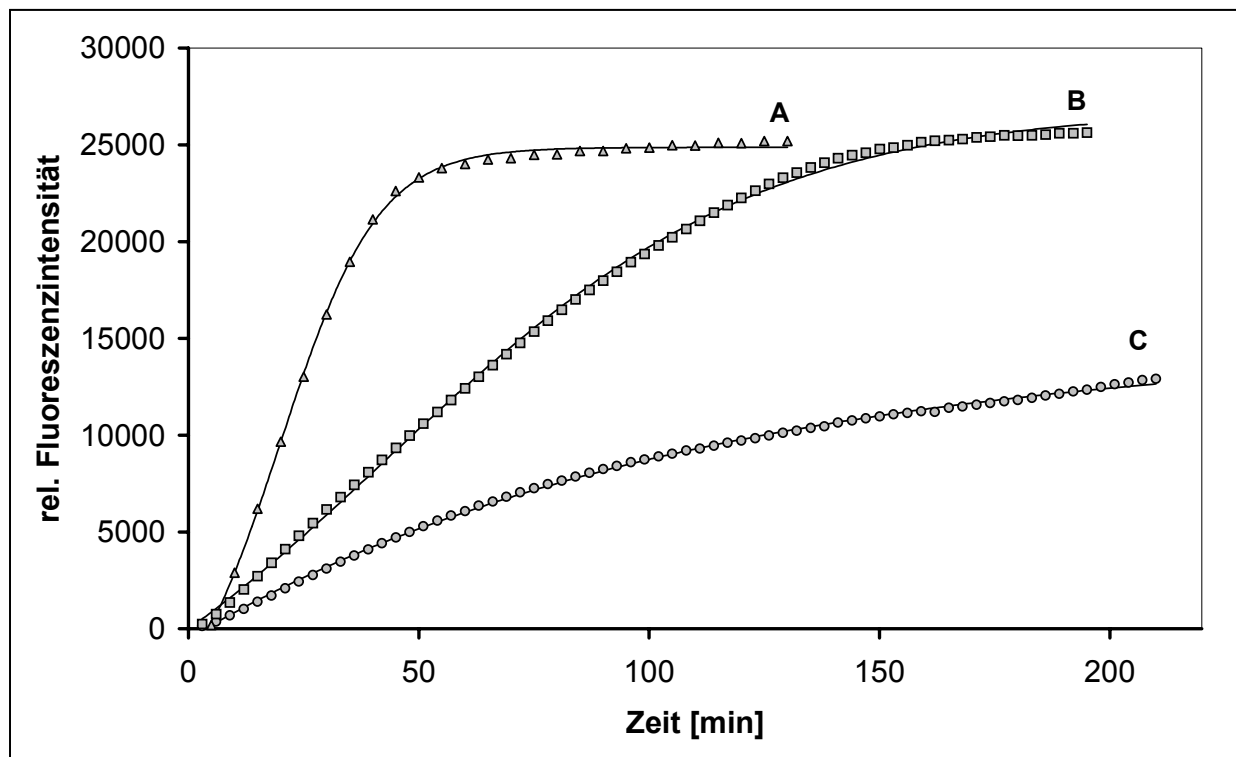


Abb. 5.15: Untersuchung des Zerfalls von PAPA/NO. Messung mit A) 50  $\mu\text{M}$ , B) 25  $\mu\text{M}$  und C) 12.5  $\mu\text{M}$  PAPA/NO. Alle Messungen wurden im sauerstofffreien Phosphatpuffer (pH = 7.25) unter Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  FNOCT 7, 50  $\mu\text{M}$  Glutathion und 10 % Pluronic durchgeführt.

Bei 50  $\mu\text{M}$  NONOat, entsprechend 100  $\mu\text{M}$  NO, d.h. bei erwartetem vollständigen Umsatz von FNOCT, wird eine Endfluoreszenz von etwa 25000 Einheiten gefunden (Kurve A). Diese wird nach etwa 70 min erreicht. Da zu diesem Zeitpunkt FNOCT vollständig verbraucht ist, spiegelt dieser Wert näherungsweise die Halbwertszeit des Zerfalls von PAPA/NO (Freisetzung von 50  $\mu\text{M}$  NO) wieder. Eine nahezu identische Endfluoreszenz liefern 25  $\mu\text{M}$  NONOat nach 150 min (Kurve B). Hier liegen äquimolare Mengen an FNOCT und NO vor. Somit gibt diese Kurve den kinetischen Verlauf der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit FNOCT wieder. Die aus Kurve B abgeschätzte Halbwertszeit der NO-Freisetzung von  $t_{1/2} = 75$  min stimmt gut mit dem Literaturwert<sup>[89]</sup> von 77 min für den Zerfall von PAPA/NO bei 22-25°C überein. Dies zeigt, dass unter den vorgegebenen Bedingungen die NO-Bildung aus dem NONOat der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionssystem ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei diesem Versuch gegenüber Kurve A reduziert, da es sich bei der Reaktion von FNOCT mit NO um eine Reaktion 2. Ordnung handelt. Somit

besteht eine Abhängigkeit zwischen Anfangskonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit. Ein Zusatz von 12.5  $\mu\text{M}$  NONOat lieferte erwartungsgemäss eine ca. halb so grosse maximale Fluoreszenzintensität von etwa 13000 Einheiten. Dieser Wert wird aufgrund der niedrigeren Anfangskonzentration von NO erst nach über 200 min erreicht.

Eine quantitative Auswertung der experimentellen Messkurven zur Ermittlung der kinetischen Konstanten erfolgte über eine mathematische Anpassung der Daten an ein zur Beschreibung der Kurven geeignetes Gleichungssystem. Das hier vorliegende Reaktionssystem kann in einfacher Weise durch die nachstehenden Reaktionssequenzen beschrieben werden:



Dabei ist die Freisetzung von NO aus dem NONOat mit  $k_1 = 1.6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [89], die nach einer Kinetik 1. Ordnung abläuft, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Gleichung 1). Wird für Reaktion 2 der experimentelle Wert  $k_2 = 170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [63] eingesetzt und vorausgesetzt, dass es sich bei Reaktion 3 um eine schnelle Reaktion ( $k_3 \geq 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) handelt, sollten die Messdaten mit einem geeigneten Programm (z.B. Predici<sup>a</sup> oder CKS<sup>b</sup>) simuliert werden können. Hierbei zeigte sich jedoch, dass keine „gute“ Übereinstimmung der simulierten Daten mit den experimentellen Kurven erreicht werden konnte. Insbesondere die Kurven A und B zeigen starke Abweichungen. Diese Beobachtungen sprechen für einen komplexeren Mechanismus des Fluoreszenzaufbaus, als er durch die oben angegebenen Reaktionen 1 - 3 beschrieben werden kann. Da bei Anwendung äquimolarer Mengen an FNOCT und NO die gleiche Endfluoreszenz erreicht wird wie bei einem Überschuss an NO, kann diese Abweichung nicht durch einen Verbrauch von NO erklärt werden. Vielmehr scheinen die Abweichungen zwischen Simulation und

<sup>a</sup> Programm zur Bestimmung kinetischer Daten für technisch-chemische Anwendungen.

<sup>b</sup> Chemical Kinetics Simulator von IBM.

Messdaten auf einen „verzögerten“ Aufbau der Fluoreszenz zurück zu führen zu sein. Hierzu können einige mögliche Effekte diskutiert werden:

Einerseits kann es zur physikalischen Fluoreszenzlöschung durch Wechselwirkung des fluoreszierenden Produktes mit Reaktanden oder noch unbekannten Intermediaten kommen. Zum Beispiel wären Wechselwirkungen des NONOates mit FNOCT oder FNOCT-NO denkbar. Hierfür würde sprechen, dass Kurve C (Überschuss an FNOCT gegenüber NO) besser einer einfachen Exponentialfunktion folgt als die Kurven A und B.

Andererseits könnte der verzögerte Fluoreszenzaufbau auch auf chemischen Ursachen beruhen. Denkbar wäre die Möglichkeit der Bildung eines nicht fluoreszierenden, NO-haltigen Zwischenproduktes, das im Verlauf der Reaktion schneller, evtl. autokatalytisch NO wieder freisetzt. Es könnte weiterhin auch eine zweistufige NO-Bildung aus dem NONOat zugrunde liegen. Für beide Fälle wurden Modellsimulationen mit CKS unter Einsatz der beschriebenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten aus den Gleichungen 1 - 3 für die Basisreaktionen durchgeführt. Keine der beiden Alternativen führte jedoch zu einer befriedigenden Übereinstimmung mit den experimentellen Intensitäts-Zeit-Verläufen. Dies legt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen des Reaktionsverlaufes, evtl. mittels anderer spektroskopischer Methoden, nahe.

Aus den derzeitig ermittelten Daten können jedoch durch empirische, mathematische Anpassungen<sup>c</sup> „experimentelle“ Halbwertszeiten der NO-Freisetzung aus NONOaten ermittelt werden (siehe oben). Ausserdem kann die Menge an NO, die durch das NONOat freigesetzt wird, näherungsweise abgeschätzt werden. So steht mit FNOCT eine Substanz zur Verfügung, mit der auch „neue“ NONOate hinsichtlich der Menge und Geschwindigkeit ihrer NO-Freisetzung untersucht werden können.

---

<sup>c</sup> Es wird eine mathematische Funktion gewählt, die den Kurvenverlauf gut wiedergibt. Als Anpassungsfunktionen wurden einfache „Übergangsfunktionen“ (sigmoide Verläufe) gewählt. Der Zeitpunkt, bei dem der halbe Sättigungswert ( $I_{t \rightarrow \infty}/2$ ) erreicht ist, wird als empirische Halbwertszeit angesehen.



### 5.3.2 Untersuchung der Reaktion von Superoxid mit Stickstoffmonoxid mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid führt zur Bildung von Peroxynitrit.<sup>[90]</sup>

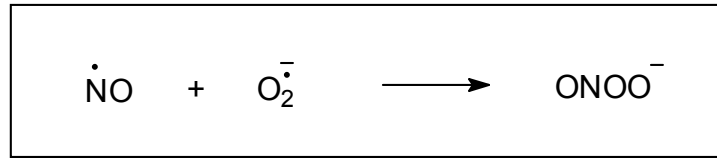


Abb. 5.16: Bildung von Peroxynitrit

Wird bei Zusammengabe eines Superoxid-Bildners mit einem NO-Donator keine Bildung von Stickstoffmonoxid beobachtet, kann dies mit einer Abreaktion des NO mit  $\text{O}_2^{\bullet -}$  erklärt werden. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung dieser Reaktion ist eine interessante Anwendung für das FNOCT-System, da hier auf einfache Weise die NO-Bildung und auch der Verbleib von NO verfolgt werden können. Als vorteilhaft im Gegensatz zur NO-Elektrode erweist sich die Möglichkeit, ohne grossen apparativen Aufwand in Abwesenheit von Sauerstoff zu messen.

Kirsch *et. al.*<sup>[91]</sup> fanden Hinweise darauf, dass bei der Autooxidation (Luftoxidation) der biologisch aktiven Verbindung Tetrahydrobiopterin (H4B) freie Superoxid-radikalanionen ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) gebildet werden. Tetrahydrobiopterin (Abbildung 5.17) wird im Säugetierorganismus synthetisiert<sup>[92]</sup> und tritt dort als CO-Faktor der NO-Synthase auf.<sup>[93,94]</sup> Wirkt die Substanz als Reduktionsmittel für Sauerstoff, können bei einer gleichzeitigen Bildung von NO über die Bildung von Peroxynitrit (Abbildung 5.16) reaktive Sauerstoff/Stickstoff-Verbindungen, wie z.B.  $\text{NO}_2^-$  und OH-Radikale auftreten, die eine schädigende Wirkung im Organismus ausüben.

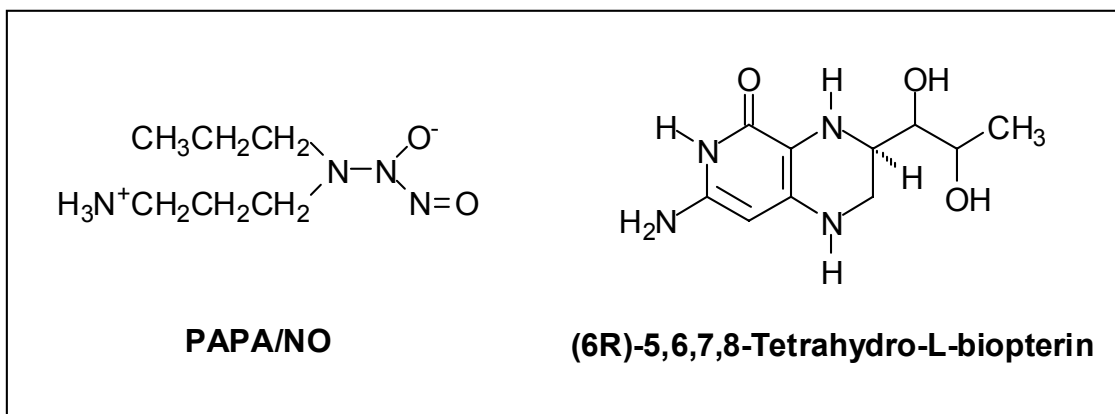


Abbildung 5.17: Chemische Formeln von PAPA/NO und Tetrahydrobiopterin.

Das zu untersuchende System bestand aus dem NO-Donator PAPA/NO (Halbwertszeit 77 min bei 22°C) und 1 mM Tetrahydrobiopterin. Bei Luftsättigung (~ 220 µM O<sub>2</sub>) sollte entsprechend den Messdaten von Kirsch<sup>[91]</sup> die Halbwertszeit der Tetrahydrobiopterin-induzierten O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung zwischen 60 und 80 min liegen. So stellen diese beiden Systeme im gleichen Zeitraum vergleichbare Mengen der Reaktanden NO und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zur Verfügung. Wird also beim Zerfall von PAPA/NO in einer sauerstoffhaltigen, mit Tetrahydrobiopterin versetzten Lösung NO frei, sollte durch dessen sofortige Abreaktion mit Superoxid keine oder nur geringe Fluoreszenz mit FNOCT zu beobachten sein. Wird unter gleichen Bedingungen in Abwesenheit von Sauerstoff gemessen, sollte nahezu die maximale Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Abbildung 5.18 zeigt die experimentellen Ergebnisse.

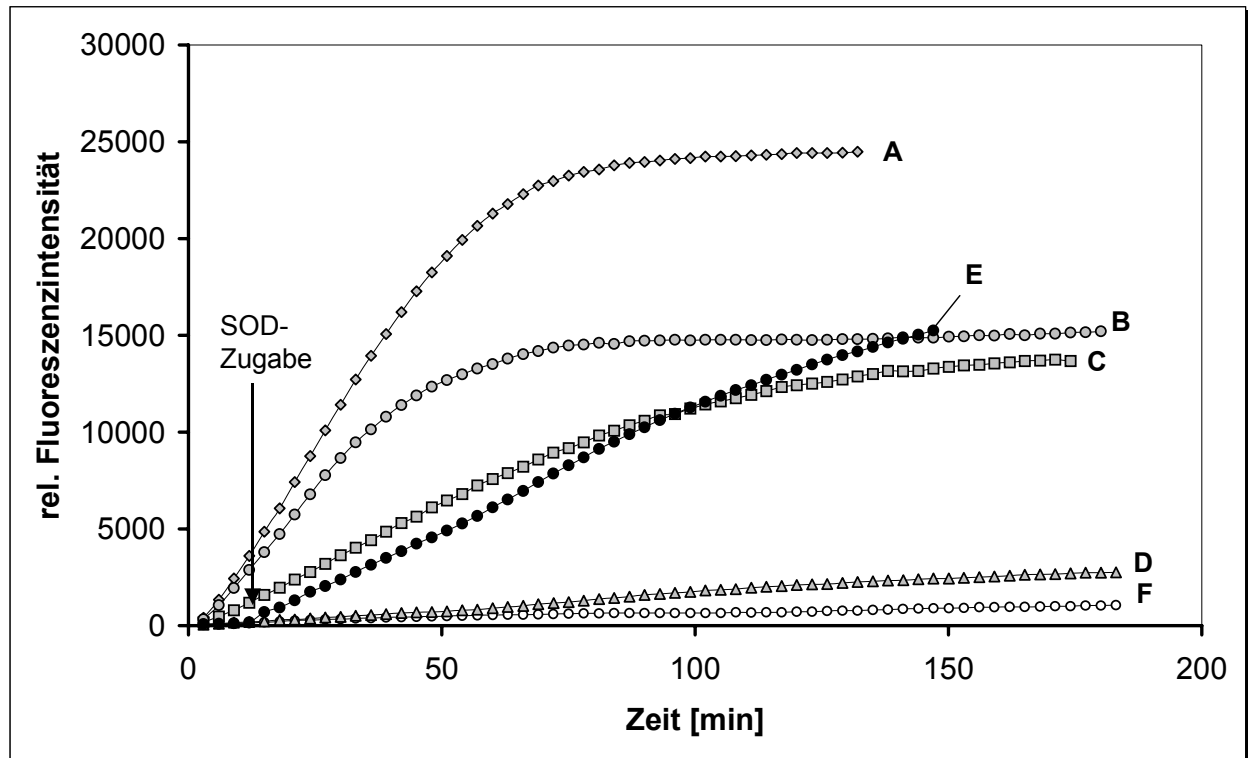


Abb. 5.18: Untersuchung der sauerstoffabhängigen Reaktion von NO mit Superoxid. Bedingungen: Phosphatpuffer (pH = 7.24) mit 50  $\mu$ M FNOCT, 10 % Pluronic, 50  $\mu$ M Glutathion (GSH) und 1 mM Tetrahydrobiopterin (H4B) A) 50  $\mu$ M PAPA/NO in Abwesenheit von H4B ohne Sauerstoff, B) 50  $\mu$ M PAPA/NO mit Sauerstoff und SOD, C) 50  $\mu$ M PAPA/NO, sauerstofffrei mit H4B, D) 50  $\mu$ M PAPA/NO mit Sauerstoff und H4B. E) wie D, jedoch nach 12 min Zugabe von 200 Units SOD, F) ohne PAPA/NO, mit Sauerstoff und H4B.

Diesen Messergebnissen können theoretische Überlegungen zur Deutung der beobachteten Konzentrations-Zeit-Verläufe gegenüber gestellt werden. So sollen die Kurven A - E (Abbildung 5.18) im Folgenden auf der Basis der in Abbildung 5.19 dargestellten Reaktionsgleichungen 4 - 13 diskutiert werden.

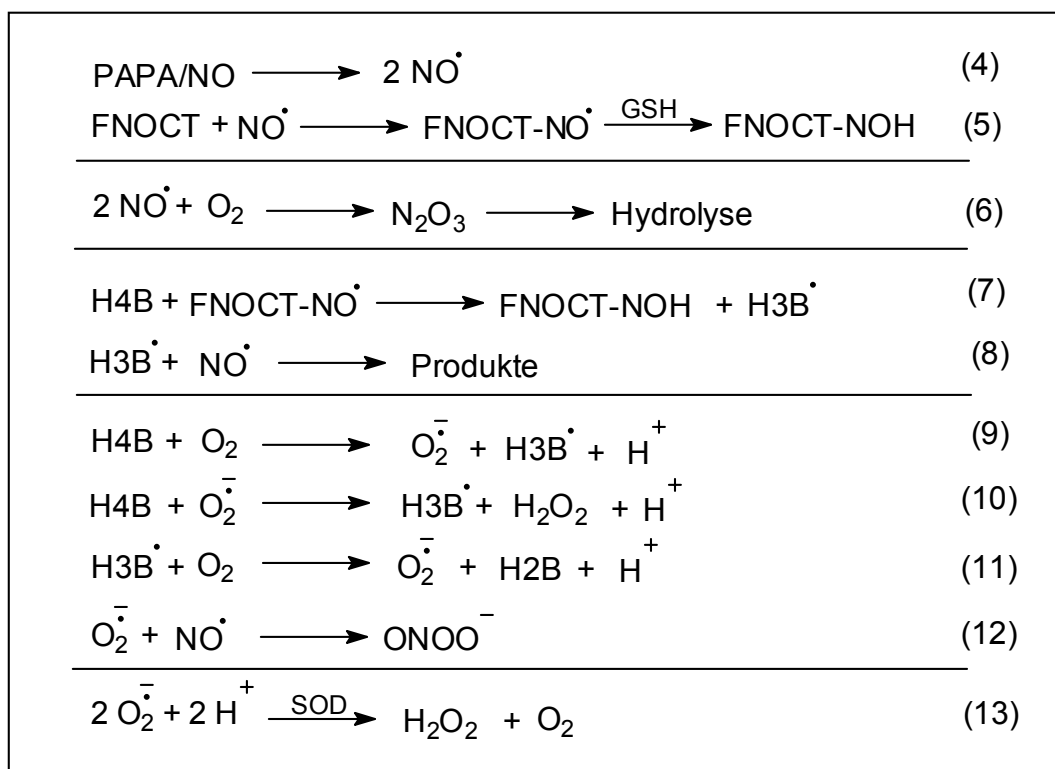


Abb. 5.19: Reaktionsgleichungen zur Deutung der in Abb. 5.18 dargestellten Messergebnisse.

Kurve A zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von PAPA/NO in Abwesenheit von H4B und Sauerstoff, jedoch in Gegenwart des Reduktionsmittels Glutathion (GSH). Hier wird die maximal mögliche Fluoreszenzintensität bei vollständigem Abfang des gebildeten Stickstoffmonoxids erhalten. Dieser Kurve liegen also die Gleichungen 4 und 5 zugrunde. Die Endfluoreszenz von ca. 25000 relativen Einheiten bei 50  $\mu\text{M}$  FNOCT stimmt mit den Ergebnissen, die bereits bei vorangegangenen Untersuchungen der NONOate (siehe auch Kapitel 5.3.1) erhalten wurden, überein.

Kurve B wurde unter sonst gleichen Bedingungen wie Kurve A in luftgesättigter Lösung (ca. 220  $\mu\text{M}$  Sauerstoff) erhalten. Die Zugabe von SOD hatte weder einen Einfluss auf den Konzentrations-Zeit-Verlauf noch auf die unter diesen Bedingungen erreichte Maximalfluoreszenz (Messdaten ohne SOD-Zusatz aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt). Die um ca. 40 % erniedrigte Maximalfluoreszenz der Kurve B ist somit auf den konkurrierenden Verbrauch von NO durch Luftoxidation zurückzuführen (Reaktion 6).

Interessanterweise führte die Zugabe von 1 mM Tetrahydrobiopterin zum FNOCT-NONOat-Reaktionssystem auch in Abwesenheit von Sauerstoff (Kurve C) zu einer um ca. 50 % erniedrigten Endfluoreszenz bei einem gleichzeitig verlangsamten Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dies bedeutet, das Tetrahydrobiopterin in guter Näherung die Hälfte des gebildeten Stickstoffmonoxids verbraucht haben muss. Eine direkte Reaktion von NO mit Tetrahydrobiopterin kann jedoch relativ sicher ausgeschlossen werden, da mit einem sehr grossen Überschuss an H4B gearbeitet wurde. Daher wäre dann ein vollständiger Verbrauch an NO zu erwarten gewesen. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die erniedrigte Endfluoreszenz ist die Annahme, dass H4B in Konkurrenz zum Glutathion (nur in einer Konzentration von 50  $\mu$ M enthalten) als gutes Reduktionsmittel (Einelektronendonator)<sup>d</sup> für das anfänglich aus FNOCT mit NO gebildete Nitroxid-Radikal wirkt und dies nach Protonenübertragung in das fluoreszierende Endprodukt FNOCT-NOH überführt (Reaktion 7). Das dabei gebildete H3B-Radikal kann nun in einer sehr schnellen (möglicherweise nahezu diffusionskontrollierten) Reaktion mit weiterem NO zu nichtradikalischen Produkten abreagieren (Reaktion 8). Diese Reaktionsfolge würde der beobachteten Stöchiometrie (50 %iger NO-Verbrauch) entsprechen. Für Kurve C gelten demnach die Reaktionen 4, 5, 7 und 8.

Wenn dieser Versuch (Anwesenheit von H4B) statt in sauerstofffreier in sauerstoffhaltiger (luftgesättigter) Pufferlösung durchgeführt wird, wird nur eine sehr geringe, langsam ansteigende Fluoreszenz beobachtet (Kurve D), die nahe am Blindwert (Kurve F, Fluoreszenzverlauf in Abwesenheit eines NO-Donators) verläuft. Diese Beobachtung zeigt, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tetrahydrobiopterin und Sauerstoff praktisch kein NO durch FNOCT abgefangen wird. Erklären lässt sich diese Tatsache mit der bereits durch andere Versuche bewiesenen<sup>[91]</sup> Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  bei der Autooxidation von Tetrahydrobiopterin (Reaktionen 9 - 11 mit  $k_9 = 0.6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{10} = 3.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1[95]}$ ,  $k_{11} = 3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1[91]}$ ). Da  $O_2^{\bullet-}$  diffusionskontrolliert mit NO zu Peroxynitrit,  $ONOO^-$ , reagiert (Reaktion 12,  $k_{12} = 4.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1[96]}$ ) kann FNOCT aufgrund der wesentlich geringeren Reaktionsgeschwindigkeit mit NO ( $k_2 = 170 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1[63]}$ ) nicht mehr in Konkurrenz zur Reaktion von NO mit Superoxid treten. Peroxynitrit bzw. seine korrespondierende

---

<sup>d</sup> Die guten Reduktionseigenschaften des H4B sind bekannt:<sup>[97]</sup> das Oxidationspotential liegt bei  $E^0 = 0.27 \text{ V}$  (gegen NHE). Für GSH beträgt es  $E^0 = 1.3 \text{ V}$  (gegen NHE).

Säure, HOONO zerfallen bei einem pH-Wert von 7.2 innerhalb von Sekunden zu Nitrat, Nitrit und Sauerstoff<sup>[98]</sup> und reagieren mit FNOCT zu nicht-fluoreszierenden Produkten. Kurve D wird somit durch die Reaktionen 4, 6, und 9 - 12 beschrieben, wobei Reaktion 10 aufgrund ihrer viel geringeren Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Reaktion 12 keinen wesentlichen Beitrag liefern sollte.

Einen klaren Beweis, dass unter diesen Bedingungen freie  $O_2^{\bullet-}$ -Radikalanionen gebildet werden, lieferte ein Experiment, bei welchem dem Reaktionsansatz mit FNOCT, H4B, NO und Sauerstoff Superoxiddismutase (SOD) zugesetzt wurde (Kurve E). SOD überführt  $O_2^{\bullet-}$  in einer nahezu diffusionskontrollierten Reaktion in  $H_2O_2$  und Sauerstoff, d.h. SOD kann mit NO um  $O_2^{\bullet-}$  konkurrieren und letzteres dem Reaktionssystem entziehen. Damit steht NO wieder für die Reaktion mit FNOCT zur Verfügung.

Vor der SOD-Zugabe wurde die in Kurve D beobachtete geringe Fluoreszenz gefunden. Die SOD-Zugabe erfolgte dann 12 min nach der NONOat-Zugabe und führte zu einem spontanen Anstieg der Fluoreszenz bis zu einem (extrapolierten) Grenzwert, der noch oberhalb der Kurven B und C liegt. Diese erzielte höhere Endfluoreszenz kann damit erklärt werden, dass nun über die Bildung von  $H_2O_2$  (Reaktion 13) die Sauerstoffkonzentration und über Reaktion 11 die H3B-Stationärkonzentration erniedrigt werden. Somit wird der NO-Verbrauch über die Reaktionen 6 und 8 vermindert.

Diese Experimente liefern demnach eine weitere Bestätigung dafür, dass Tetrahydrobiopterin direkt Sauerstoff zum Superoxidradikalanion reduzieren kann. Ebenso kann aus den Versuchen abgeleitet werden, dass Superoxid mit gleichzeitig gebildetem Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagiert.

### **5.3.3 Untersuchung der Reaktion von Ascorbinsäure und Sauerstoff mit Stickstoffmonoxid**

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist eine essentielle Verbindung, die im Säugetierorganismus vielfältige Funktionen ausübt<sup>[99]</sup>. Neben der Verhinderung von Krankheiten wie Skorbut<sup>[99]</sup> wirkt sie als generelles Antioxidans (Radikalfänger). Beschrieben ist der Abfang von Superoxidradikalen<sup>[100]</sup> durch Ascorbinsäure unter

Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ascorbinsäure kommt in vielen Geweben des Körpers vor. Die höchste Anreicherung findet man in Geweben mit hohem Stoffwechsel, z. B. in der Leber (10-16 mg/100 g Gewebe) oder in den Nebennieren (30-40 mg/100 g Gewebe)<sup>[101]</sup>. Die Reaktionen der Ascorbinsäure beinhalten auch Wechselwirkungen mit Stickstoff-Sauerstoffverbindungen, wie Nitrit und Nitrosaminen. Dabei kann Ascorbinsäure die Bildung von Nitrosaminen aus Nitrit verhindern, indem sie das im Magen aus zwei Molekülen  $\text{NO}_2^-$  gebildete  $\text{N}_2\text{O}_3$ , welches als Nitrosierungsreagenz auftritt, zu NO reduziert. Aus Ascorbinsäure bildet sich bei dieser Reaktion das Ascorbylradikal.

Ihre Wirkung als Reduktionsmittel macht die Ascorbinsäure auch für die hier behandelte Thematik interessant. So wurde in vorangegangenen Arbeiten<sup>[63,71]</sup> das aus FNOCT 7 durch Reaktion mit NO gebildete Nitroxid-Radikal **7-NO** mittels Ascorbinsäure zum Hydroxylaminanion **7-NO<sup>-</sup>** reduziert, welches bei physiologischem pH-Wert spontan zum Hydroxylamin 7-NOH protoniert wird. Hierbei wurde meist mit NO-Lösungen gearbeitet, um das Hydroxylamin gezielt darstellen zu können. Ascorbinsäure erwies sich bei diesen Untersuchungen als das wirksamste der getesteten Reduktionsmittel.

Bei Experimenten mit NONOaten (z. B.: MAHMA/NO, PAPA/NO und Spermin/NO), deren Zerfall in sauerstoffhaltiger Lösung detektiert werden sollte, bereitete der Zusatz der Ascorbinsäure jedoch einige Schwierigkeiten. Es wurde nicht die erwartete Zerfallskinetik der NONOate mittels FNOCT gemessen, sondern abweichend davon eine S-förmige Kurve (Abbildung 5.20). In der Literatur<sup>[102]</sup> war ein vergleichbares Phänomen bereits beschrieben worden. Man beobachtete eine verzögerte Relaxation der Muskulatur von Rattenaorten durch Spermin/NO in Anwesenheit von Ascorbinsäure gegenüber der Muskelrelaxation durch Spermin/NO in Abwesenheit von Ascorbinsäure, die nicht geklärt werden konnte.

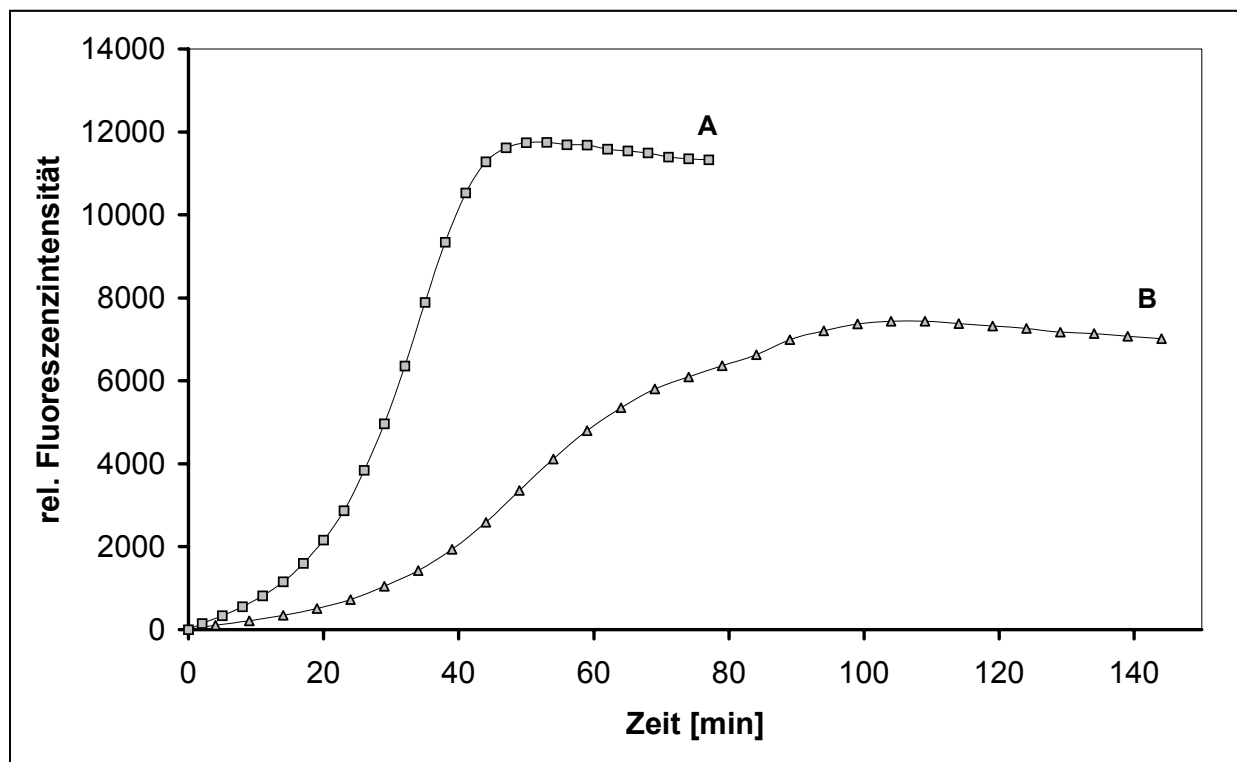


Abb. 5.20: Verzögerte NO-Detektion bei Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure in einer Messlösung mit 50  $\mu\text{M}$  FNOCT 7, 10 % Pluronic in Phosphatpuffer, pH = 7.24 und A) 50  $\mu\text{M}$  PAPA/NO, bzw. B) 50  $\mu\text{M}$  Spermin/NO. Anwesenheit von Sauerstoff, 25°C.

Für die kinetischen Untersuchungen wurde folglich ein anderes Reduktionsmittel gesucht, bzw. die Messungen wurden ohne Zusatz eines Reduktionsmittels durchgeführt. Als alternatives Reagenz empfiehlt sich Glutathion (GSH). Es kommt in noch höherer Konzentration als Ascorbinsäure in den meisten Zellen des Säugetierorganismus vor. Da der Reduktionsmechanismus dem der Ascorbinsäure ähnlich ist, kann diese somit im Experiment gut durch GSH substituiert werden. Ascorbinsäure ist jedoch das stärkere der beiden Reduktionsmittel, da es, wie Abbildung 5.21 zeigt, zwei Elektronen abgibt, während Glutathion ein Einelektronendonator ist.

Die Messungen unter Zusatz von Glutathion und ohne Reduktionsmittel sind in Abbildung 5.22 zusammengefasst.



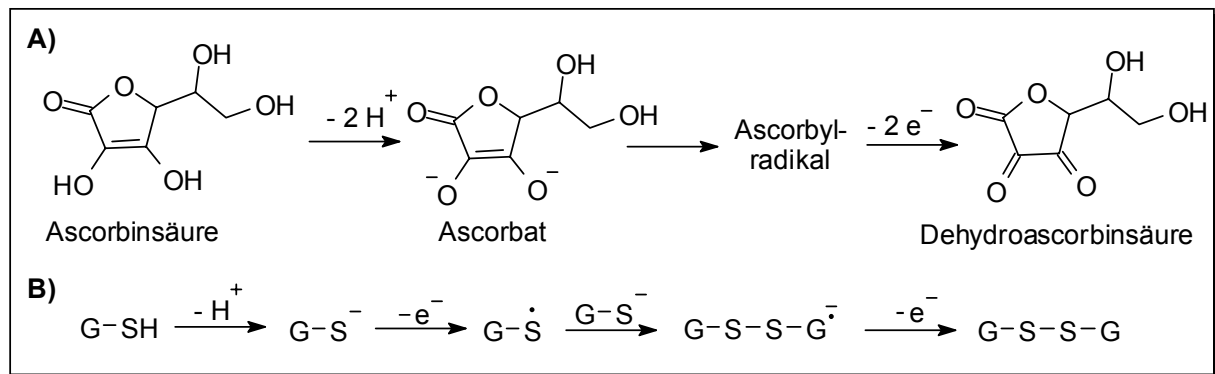


Abb. 5.21: Mechanismus der reduktiven Wirkung von A) Ascorbinsäure und B) Glutathion. Ascorbinsäure reagiert unter Abgabe zweier Protonen zu Ascorbat, das dann über ein Ascorbylradikal durch Abgabe von zwei Elektronen zur Dehydroascorbinsäure oxidiert wird. Diese ist eine instabile Substanz, die schnell mit Wasser zu 2,3-Diketogulonsäure umgesetzt wird<sup>[103]</sup>. Bei der Oxidation des Glutathionats aus GSH zum Radikal wird ein Elektron frei. Anschliessend entsteht ein Disulfid<sup>[104]</sup>.

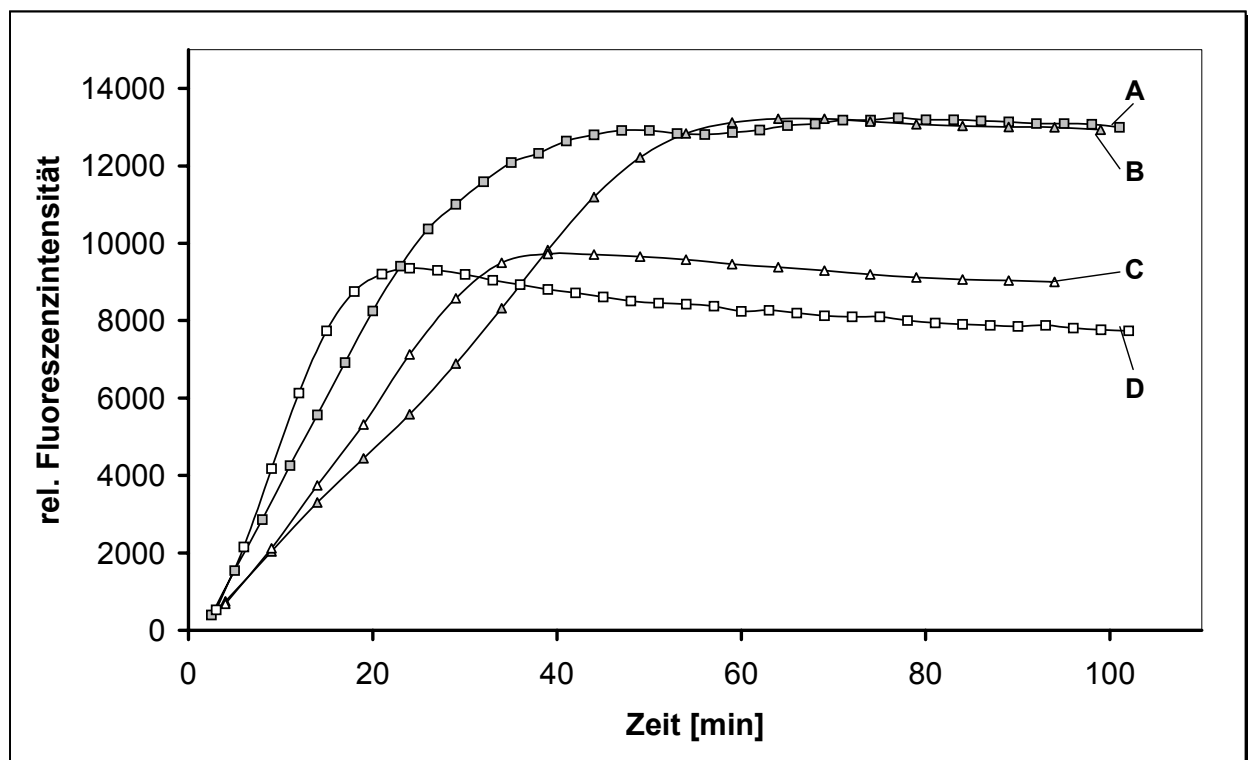


Abb. 5.22: Detektion der NO-Freisetzung ohne Reduktionmittel, bzw. mit Glutathion (GSH) als Reduktionmittel: jeder Ansatz enthält 50  $\mu$ M FNOCT 7 und 10 % Pluronic in Phosphatpuffer, pH = 7.24. Dazu kommt A) 50  $\mu$ M PAPA/NO und 50  $\mu$ M GSH, B) 50  $\mu$ M Spermin/NO und 50  $\mu$ M GSH, C) 50  $\mu$ M PAPA/NO, und D) 50  $\mu$ M Spermin/NO. Alle Messungen wurden unter Sauerstoffeinfluss bei 25°C durchgeführt.

Vergleicht man alle Kurven aus Abbildung 5.20 und 5.22 miteinander, wird deutlich, dass Ascorbinsäure abhängig von der Halbwertszeit des verwendeten NONOates einen hemmenden Effekt auf die Detektion von Stickstoffmonoxid ausübt. Mit Glutathion wird dies ebensowenig beobachtet wie ohne Reduktionsmittel. Die Kurven, die ohne Zusatz eines Reduktionsmittels aufgenommen wurden, verlaufen um ca. 4000 Einheiten der relativen Fluoreszenzintensität geringer als die mit GSH gemessenen Kurven. Dies ist wahrscheinlich auf Abreaktion des Nitroxids **7-NO** zu nicht fluoreszenzfähigen Nebenprodukten zurückzuführen.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass durch die Ascorbinsäure in Gegenwart von Sauerstoff ein Abbau der NO-Konzentration ermöglicht wird. Dies wurde durch Zugabe von Ascorbinsäure zu einer Probe geklärt, in der sich bereits ein NONOat ohne Reduktionsmittel im Zerfall befindet. Der Einfluss einer Ascorbinsäure- Zugabe nach 15 min bzw. 20 min des Zerfalls von Spermin/NO im Vergleich mit einer unbeeinflussten NO-Bildung ist in Abbildung 5.23 dargestellt.

Die Zugabe der Ascorbinsäure wirkt sich spontan auf die Detektion des NO aus: sie kommt sofort zum Stillstand. Dafür sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnte das NONOat in der Freisetzung von NO gehemmt werden. Da sich aber in der Lösung eine stationäre Konzentration an NO befindet, sollte dies nicht zu einer spontanen, sondern eher einer langsameren Abnahme der NO-Konzentration führen. Weiterhin sollte bei einer Hemmung der NO-Freisetzung, d. h. einer chemischen Reaktion von Spermin/NO mit Ascorbinsäure, das FNOCT nicht mehr in der Lage sein, weiteres NO abzufangen. Dies ist aber der Fall, da es bei beiden Versuchen nach ca. 70 min wieder zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt, was bedeutet, dass weiterhin NO freigesetzt wird. So ist die zweite Variante, dass durch das NONOat gebildetes NO schnell durch Ascorbinsäure abgefangen wird, wahrscheinlicher. Der langsame Wiederanstieg der beiden Kurven nach ca. 70 min spricht für diesen Weg, da dieser Zeitverlauf einen vollständigen Verbrauch der Ascorbinsäure zu diesem Zeitpunkt anzeigt.

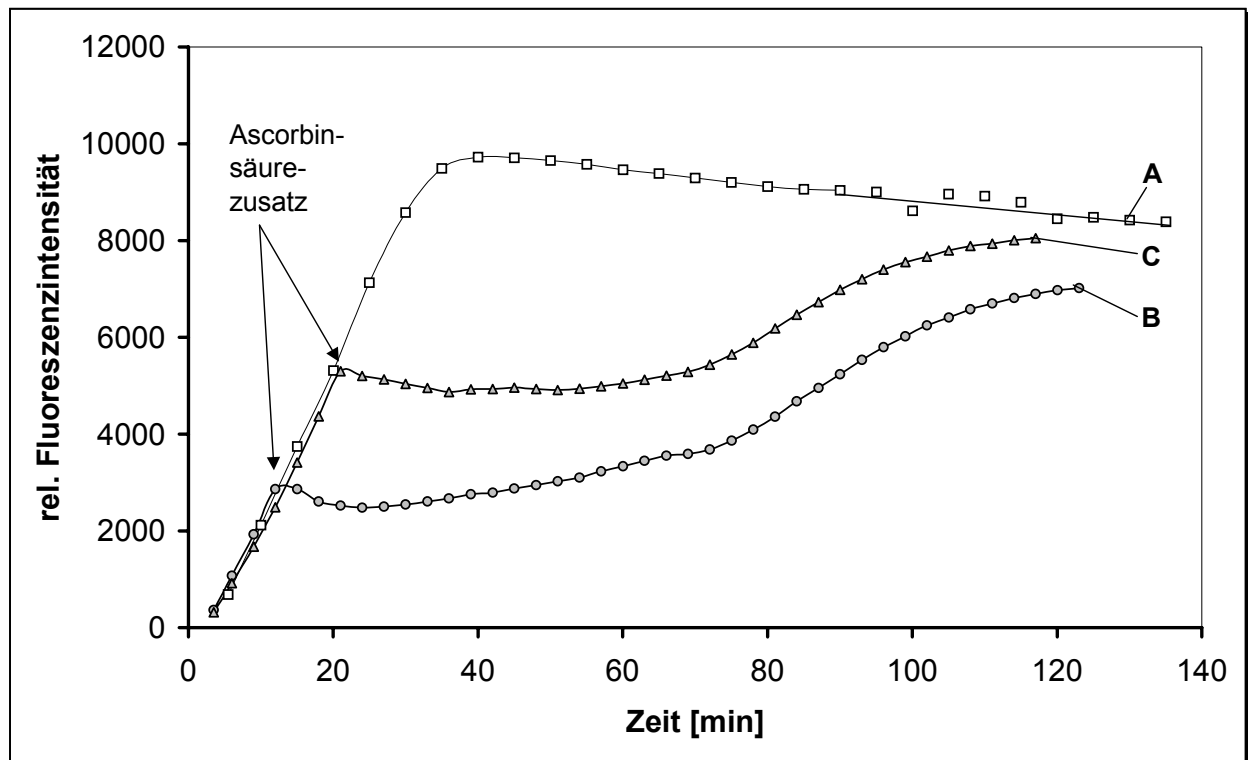


Abb. 5.23: Zerfall von 50  $\mu\text{M}$  Spermin/NO in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.24$ ) mit 50  $\mu\text{M}$  FNOCT und 10 % Pluronic A) ohne Zusatz eines Reduktionsmittels, B) mit Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure nach 15 min und C) nach 20 min. Bedingungen: Anwesenheit von Sauerstoff, 25°C.

Ascorbinsäure ist jedoch nicht der einzige Parameter, der die Veränderung der Kinetik hervorruft. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Anwesenheit von Sauerstoff. Vergleicht man den kinetischen Verlauf ascorbinsäurehaltiger Messansätze mit und ohne Sauerstoff, werden gänzlich unterschiedliche Kinetiken beobachtet (Abbildung 5.24).

Am Beispiel des Zerfalls von PAPA/NO kann gezeigt werden, dass unter Sauerstoffausschluss (Kurve A) eine erheblich höhere relative Fluoreszenzintensität (ca. 25.000 Einheiten) und ein sehr schwacher sigmoider Kurvenverlauf gefunden wird. Zerfällt PAPA/NO unter Sauerstoffeinfluss (Kurve B), folgt die Fluoreszenzintensität einer sigmoiden Kurve mit einer etwa um die Hälfte geringeren Endfluoreszenz von ca. 10.000 Einheiten.

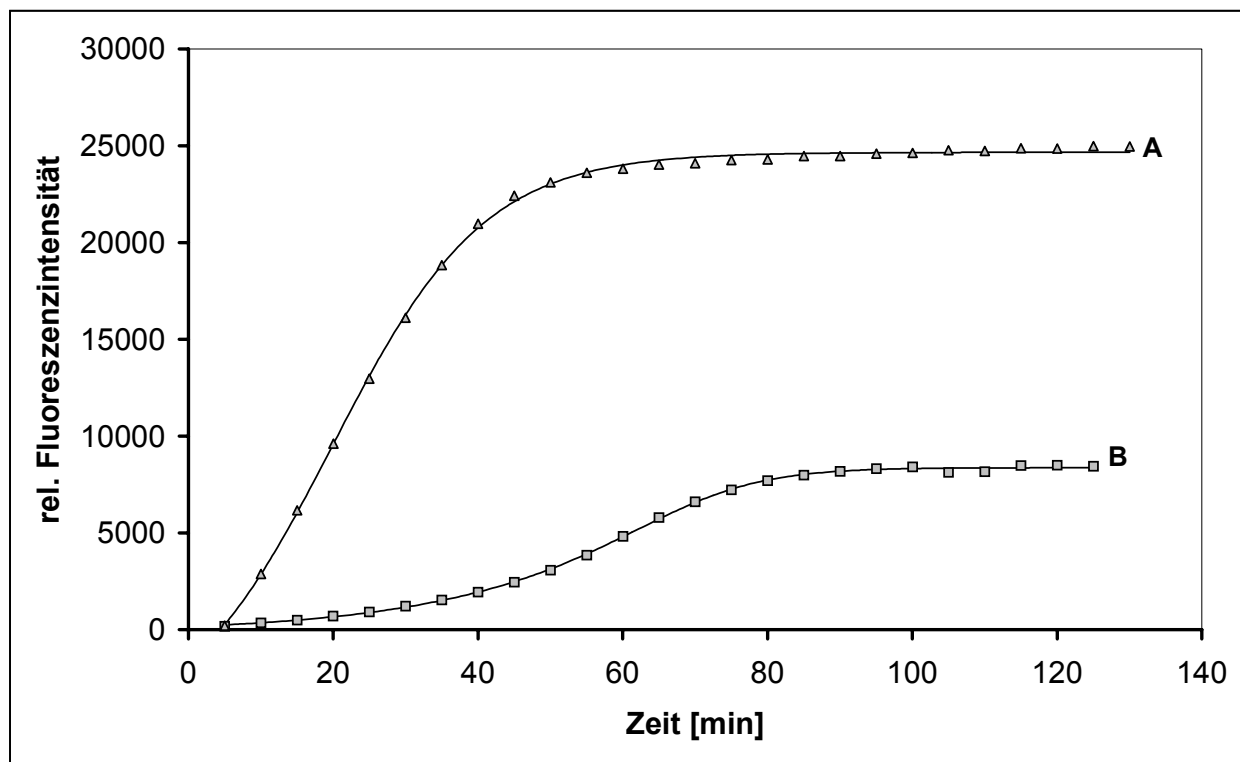


Abb. 5.24: Zerfall von 50  $\mu\text{M}$  PAPA/NO in einer Phosphatpufferlösung ( $\text{pH} = 7.24$ ) mit 100  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt: A) sauerstofffrei und B) luftgesättigt (ca. 220  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ ). Es wurden 50  $\mu\text{M}$  FNOCT 7 und 10 % Pluronic zugesetzt.

Da alle durchgeführten Messungen neben Ascorbinsäure auch noch den Fluoreszenzfarbstoff FNOCT 7 und den Lösungsvermittler Pluronic F127 enthalten, muss ausgeschlossen werden, dass es diese Komponenten sind, die in Wechselwirkung mit Ascorbinsäure und Sauerstoff zu einem Verbrauch von NO führen. Als Konsequenz daraus ergibt sich die Notwendigkeit, eine andere Messmethode einzusetzen. Im vorliegenden Fall wurde die NO-Bildung in einer Phosphatpuffer-Lösung von Spermin/NO mittels einer NO-Elektrode verfolgt.

Die NO-Elektrode ist in der Lage, stationäre Konzentrationen an gebildetem NO in einer Messlösung zu erfassen. Eine integrative Messung, wie sie bei der FNOCT-Methode vorliegt, ist nicht oder nur eingeschränkt möglich. Die Elektrode ermöglicht aber quantitative Bestimmungen der Konzentration an NO in der Messlösung mit Hilfe eines Standards. Um für die folgenden Experimente den Messbereich festzulegen, wurden zunächst Bestimmungen der stationären NO-Konzentration nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Spermin/NO vorgenommen. Hierzu

wurde die NO-Bildung aus 10, 20 und 30  $\mu\text{M}$  Spermin/NO in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.25$ ) über einen Zeitraum von ca. 20 min beobachtet. Über die zuvor durchgeführte Kalibrierungsmessung konnte die Konzentration an NO bestimmt werden. Die Kurven sind in Abbildung 5.25 aufgeführt.

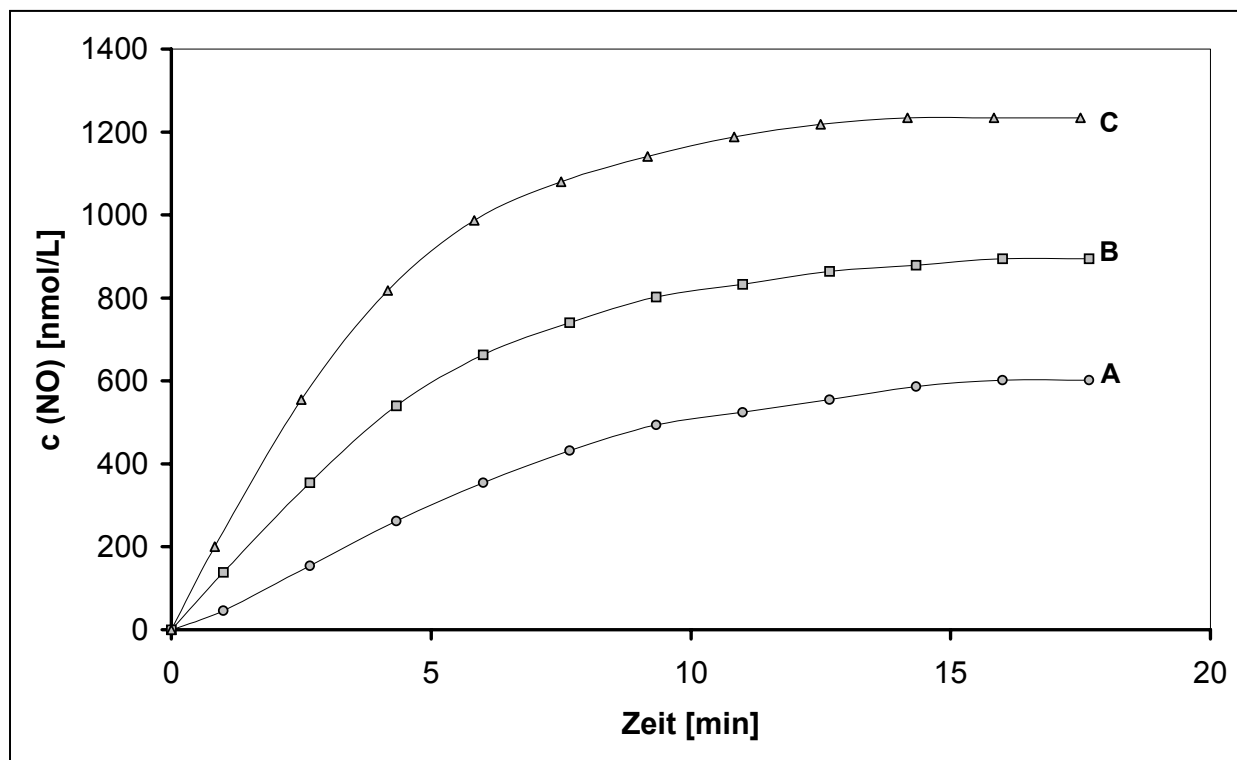


Abb. 5.25: Konzentrationsbestimmung mit der NO-Elektrode: NO-Bildung aus A) 10  $\mu\text{M}$ , B) 20  $\mu\text{M}$  und C) 30  $\mu\text{M}$  Spermin/NO in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.25$ ) in Gegenwart von Luftsauerstoff.

Die Messkurven zeigen, dass die Stationärkonzentration des Zerfalls von 30  $\mu\text{M}$  Spermin/NO nur etwa 1.2  $\mu\text{M}$  NO beträgt. Dies beweist, dass ein grosser Teil des gebildeten Stickstoffmonoxids direkt mit dem in der Lösung vorhandenen Sauerstoff abreagiert.

Um die Wirkung der Ascorbinsäure auf die NO-Freisetzung zu untersuchen, wurden die nachfolgenden Experimente mit 30  $\mu\text{M}$  Spermin/NO durchgeführt. Das NONOat zerfiel bis zur Gleichgewichtskonzentration. Dann wurden unterschiedliche Konzentrationen an Ascorbinsäure zugesetzt. Abbildung 5.26 zeigt die resultierenden Kurven.

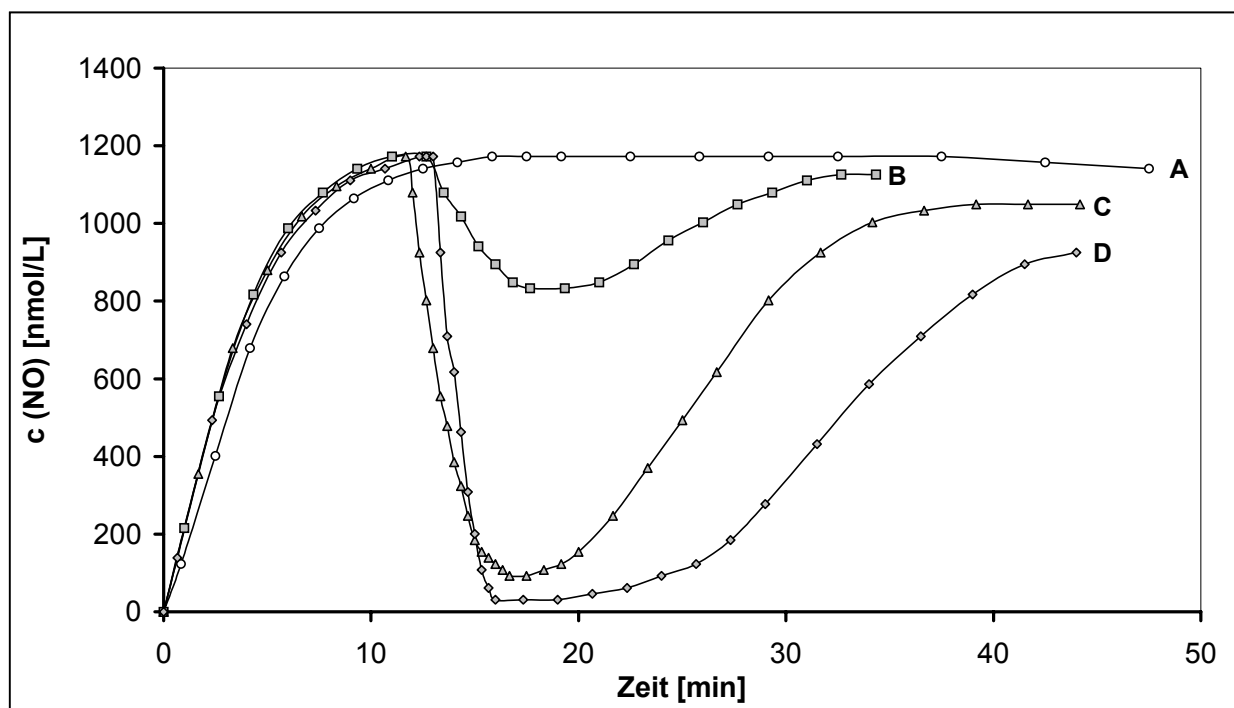


Abb. 5.26: A) Zerfall von  $30\ \mu\text{M}$  Spermin/NO in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.25$ ) bei  $25^\circ\text{C}$  unter Sauerstoffeinfluss: nach ca. 12 min erfolgte die Zugabe der Ascorbinsäure bis zu einer Endkonzentration von B)  $0.50\ \mu\text{M}$ , C)  $1.25\ \mu\text{M}$  und D)  $2.50\ \mu\text{M}$  Ascorbinsäure.

Die Konzentrationen an Ascorbinsäure wurden der Stationärkonzentration an gebildetem NO angepasst. So wurde bei NO-Konzentrationen von  $1.27\ \mu\text{M}$  mit  $0.50\ \mu\text{M}$ ,  $1.25\ \mu\text{M}$  und  $2.50\ \mu\text{M}$  Ascorbinsäure gemessen. Mit  $0.50\ \mu\text{M}$  Ascorbinsäure wird nach kurzem Abfall der Messkurve ein langsamer Wiederanstieg innerhalb von ca. 17 min beobachtet. Setzt man  $1.25\ \mu\text{M}$ , also eine etwa äquimolare Menge an Ascorbinsäure zu, wird ein Abfall der Messkurve auf etwa  $0.7\ \mu\text{M}$  NO beobachtet. Ein Wiederanstieg der Kurve tritt innerhalb von 20 min ein. Nach Zugabe von  $2.50\ \mu\text{M}$  Ascorbinsäure findet ein vollständiger Verbrauch der Ascorbinsäure innerhalb kürzester Zeit (ca. 3 min) statt. Die Kurve steigt nach ca. 23 min wieder langsam an. Bei keiner der gemessenen Kurven mit Ascorbinsäure wird das Niveau der Kurve erreicht, das in Abwesenheit von Ascorbinsäure gemessen wird. Dies ist, da NO aus der Messlösung entfernt wurde, auf das langsame Absinken der NO-Gleichgewichtskonzentration mit fortschreitendem Zerfall des NONOates zurückzuführen.

Mit den vorliegenden Experimenten an der NO-Elektrode konnten die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmessungen bestätigt werden. Wichtig ist, festzustellen, dass ein Einfluss des FNOCT-Systems auf die Reaktion der Ascorbinsäure und des Sauerstoffes mit NO ausgeschlossen werden kann. Es zeigte sich aber vor allem, dass Ascorbinsäure in Gegenwart von Sauerstoff kein universell geeignetes Reduktionsmittel für das FNOCT-System darstellt. Insbesondere für Messungen mit kleinen stationären NO-Konzentrationen, wie sie bei langsam zerfallenden NO-Donatoren oder geringen NO-Mengen auftreten, wird die Messung hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und des kinetischen Verlaufes stark beeinflusst. In sauerstofffreien Messansätzen zeigt Ascorbinsäure jedoch keinen negativen Einfluss und auch bei hohen Stationärkonzentrationen an NO, wie z. B. bei der Messung von NO-Lösungen, ist ihr Einfluss im Zusammenhang mit Sauerstoff vernachlässigbar.

Als besseres Reduktionsmittel hat sich Glutathion für die Anwendung mit dem FNOCT-System in sauerstoffhaltiger Lösung erwiesen, da GSH auch bei hoher Konzentration nur eine geringe Reaktivität gegenüber NO zeigt.

Die Reaktion von Ascorbinsäure mit Stickstoffmonoxid unter Sauerstoffeinfluss gehört zu den in der Literatur wenig beschriebenen Reaktionen des Stickstoffmonoxids. So stellt sich die Frage, wie eine solche Reaktion ablaufen könnte. Dies erfordert einige Betrachtungen hinsichtlich der Reaktivität sowohl von NO als auch von Ascorbinsäure in wässriger, sauerstoffhaltiger Lösung.

Stickstoffmonoxid ist in der Lage, mit Sauerstoff zu reagieren. Diese Reaktion liefert weitere reaktive Spezies, die ihrerseits in der Lage sind, mit Stickstoffmonoxid zu reagieren. Einige wichtige Reaktionen sind in Abbildung. 5.27 zusammengefasst.

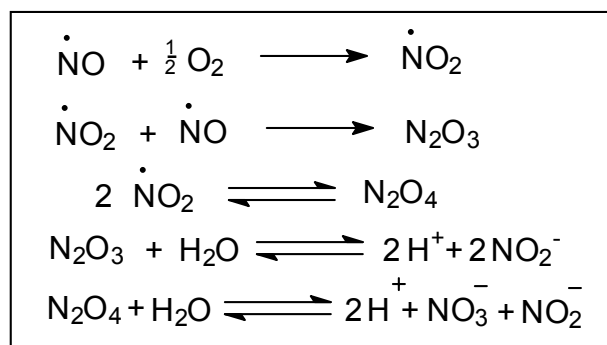


Abb. 5.27: Reaktionen von Stickstoffmonoxid mit Sauerstoff und daraus resultierende Folgereaktionen. <sup>[105,106,107]</sup>

Eine direkte Reaktion von Ascorbinsäure mit Stickstoffmonoxid ist eher auszuschliessen. Wahrscheinlicher ist die Bildung eines Ascorbylradikals, welches dann NO angreift. Das Ascorbylradikal kann durch unterschiedliche Reaktionen aus Komponenten, die in einer wässrigen, sauerstoffhaltigen NO-Lösung auftreten, gebildet werden (Abbildung 5.28). In der Literatur<sup>[108]</sup> wurde das Ascorbylradikal unter vergleichbaren Bedingungen (Messlösung mit Sauerstoff und Ascorbinsäure; Zusatz von NO-Gas) mittels ESR detektiert. Die Bildung des Ascorbylradikals erfolgte erst nach Zugabe des Stickstoffmonoxidgases zur Messlösung. So scheint tatsächlich die Reaktion zwischen Sauerstoff und NO die zur Bildung des Ascorbylradikals notwendigen reaktiven Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen zu liefern.

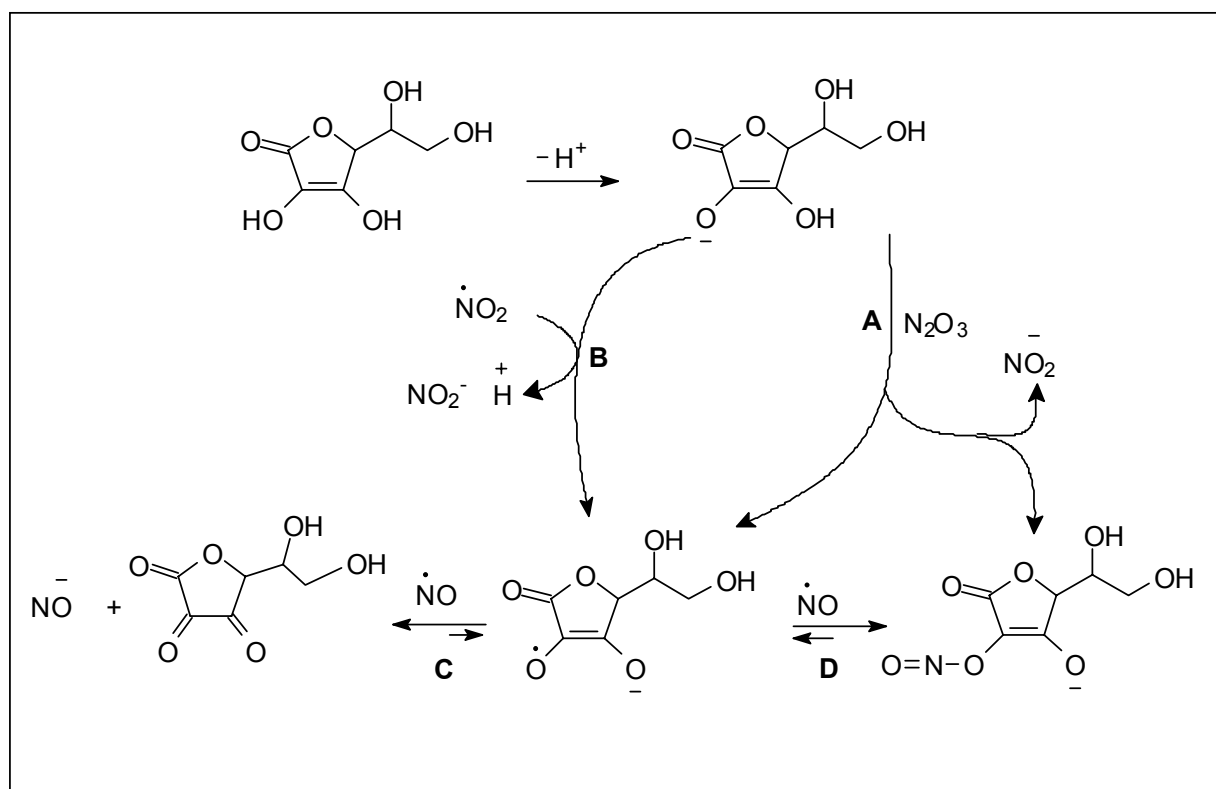


Abb. 5.28: Ascorbinsäure bzw. Ascorbat kann durch  $N_2O_3$  (A) oder durch  $NO_2$  (B) zum Ascorbylradikal umgesetzt werden<sup>[101]</sup>. Die Abreaktion könnte über Weg C<sup>[109]</sup> oder Weg D ablaufen.

Basierend auf den Untersuchungsergebnissen von GORBUNOV *et al.*,<sup>[108]</sup> dass in sauerstoff- und stickstoffmonoxidhaltiger Lösung nach dem oben beschriebenen oder einem anderen Mechanismus ein Ascorbylradikal gebildet werden kann, sollten mit diesem Reaktionen mit Stickstoffmonoxid möglich sein. Zwei Vorschläge zur



Abreaktion des Ascorbylradikals zeigt Abbildung 5.28. Über Weg C könnte Dehydroascorbinsäure und  $\text{NO}^-$  gebildet werden. Weg D könnte durch Radikalrekombination eine Nitrosooxo-Verbindung liefern. Ähnliche Verbindungen sind in der Literatur<sup>[110]</sup> bekannt.

Die vorstehend beschriebenen Experimente belegen eine bislang wenig beschriebene Reaktion von Ascorbinsäure und Sauerstoff mit Stickstoffmonoxid. Die Ergebnisse, die mit Hilfe des FNOCT-Systems erhalten wurden, konnten durch Messungen mit der NO-Elektrode bestätigt werden. Über den zugrunde liegenden Mechanismus kann an dieser Stelle jedoch nur spekuliert werden, da sich zu dessen Klärung weitergehende Experimente, wie z. B. Analysen der Reaktionsprodukte, anschliessen müssen.

Der Einfluss der Ascorbinsäure auf den NO-Spiegel in luftgesättigten Systemen kann aber noch in weiterer Hinsicht von Interesse sein. Da mit Hilfe der FNOCT-Methode Untersuchungen an biologischen Systemen erfolgen können, die zum einen Sauerstoff und zum anderen auch Antioxidantien, wie z. B. die Ascorbinsäure enthalten, sollte in einer gesonderten Experimentalserie der Einfluss von Sauerstoff und Ascorbinsäure auf die Zerfallskinetik von NONOaten bei verschiedenen Konzentrationen an NO, bzw. auf die Reaktion von FNOCT mit NO untersucht werden. Das hierfür verwendete N-Diazeniumdiolat war in diesem Fall MAHMA/NO, welches mit einer Halbwertszeit von etwa 3 min bei 25°C<sup>[89]</sup> sehr schnell zerfällt, so dass schon zu Beginn der Reaktion genügend NO zur Detektion vorliegt. Dadurch kommt die Wirkung der Ascorbinsäure unter Sauerstoffeinfluss weniger stark zur Geltung als bei langsam zerfallenden NONOaten (vergl. PAPA/NO und Spermin/NO, Abbildung 5.20).

Die zugesetzten Mengen an MAHMA/NO wurden so gewählt, dass das NONOat als Unterschusskomponente vorlag. So wurde einer Messlösung mit 50  $\mu\text{M}$  FNOCT und 50  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure MAHMA/NO bis zu Endkonzentrationen von 8, 17, 25 und 33  $\mu\text{M}$  zugesetzt und der jeweilig resultierende Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 5.29).

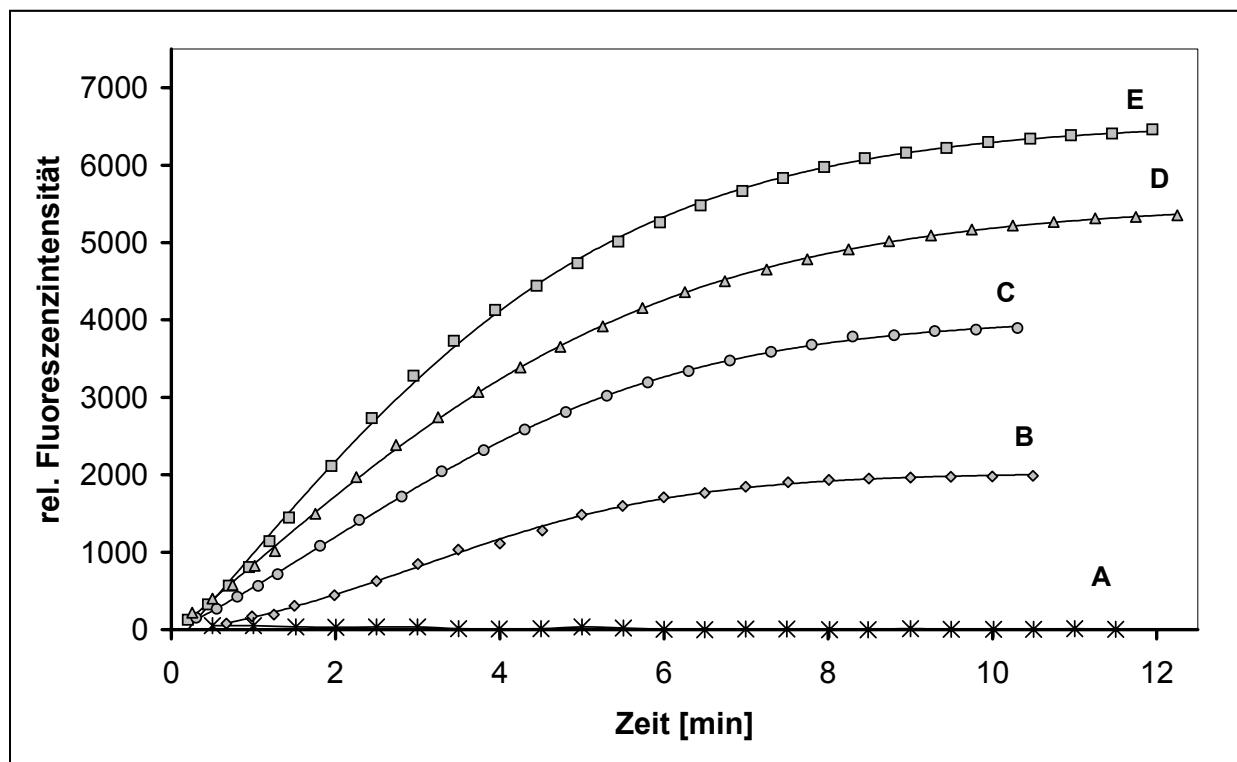
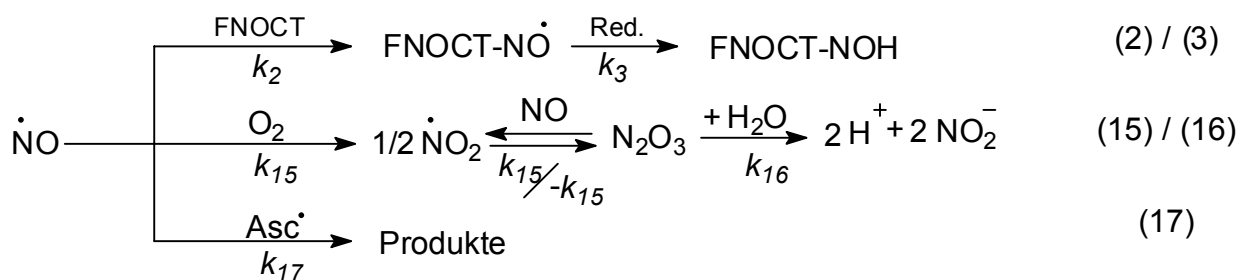
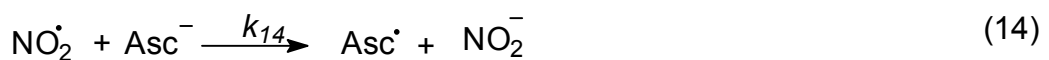


Abb. 5.29: Detektion von NO aus MAHMA/NO unter Sauerstoffeinfluss (Luftsättigung,  $220 \mu\text{M O}_2$ ) bei  $25^\circ\text{C}$  in Phosphatpuffer ( $\text{pH} = 7.25$ ) mit 10 % Pluronic,  $50 \mu\text{M FNOCT}$  und  $50 \mu\text{M Ascorbinsäure}$ . Zusatz von A)  $0 \mu\text{M}$  (Leerwert), B)  $8 \mu\text{M}$ , C)  $17 \mu\text{M}$ , D)  $25 \mu\text{M}$  und E)  $33 \mu\text{M NONOat}$ .

In Gegenwart von Sauerstoff und Ascorbinsäure wurde insgesamt eine relativ geringere Fluoreszenzintensität von maximal 6500 Einheiten beobachtet, verglichen mit einer bestimmten Maximalfluoreszenz von etwa 23600 Einheiten nach dem Zerfall von MAHMA/NO unter Einfluss von Ascorbinsäure, aber in Abwesenheit von Sauerstoff (Messdaten nicht gezeigt). Eine naheliegende Erklärung für diesen Effekt ist die Annahme, dass ein Teil des gebildeten Stickstoffmonoxids direkt mit Sauerstoff abreagiert. Die bei dieser Reaktion gebildeten Stickstoffoxide  $\text{NO}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}_3$  werden mit FNOCT nicht erfasst. Ein weiterer Teil reagiert wahrscheinlich mit dem gebildeten Ascorbylradikal. Die Konzentrationen an MAHMA/NO wurden so gewählt, dass sie etwa in gleichen Abständen von 8 - 9  $\mu\text{M}$  lagen. So konnte man in Abbildung 5.29 bereits erkennen, dass auch die Abstände zwischen den Endwerten der Messkurven etwa gleich sind. Erwartungsgemäss wird auch hier eine Abhängigkeit zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Anfangskonzentration, wie zuvor beim PAPA/NO (siehe Kapitel 5.3.1), beobachtet.

An diese Kurven konnte eine Exponentialfunktion besser angepasst werden, als dies bei dem Experiment mit PAPA/NO möglich war. Trotzdem zeigten die Kurven vor allem zu Beginn des Zerfalls, bei noch sehr kleinen NO-Konzentrationen, starke Abweichungen, die durch einen sigmoiden Verlauf gekennzeichnet waren. Dies wird häufig für den letzten Schritt von Folgereaktionen<sup>[111]</sup> beobachtet, insbesondere, wenn der vorletzte Schritt langsamer ist als der Letzte. Zudem wirkt sich hier ebenfalls der Einfluss der Ascorbinsäure auf die Reaktion aus, da diese mit einem Teil des Stickstoffmonoxids reagiert. Dies führt dazu, dass insbesondere kurz nach Zugabe des NONOates, d. h., wenn erst kleine Mengen an NO gebildet wurden, der Abfang von NO durch Ascorbinsäure einen starken Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausübt. Dieser Effekt ist allerdings bei MAHAMA/NO bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den NONOaten mit längerer Halbwertszeit.

Um die vorhandenen Messdaten einer kinetischen Analyse zu unterziehen, musste zunächst ein erweitertes Gleichungssystem zugrunde gelegt werden, welches die parallel ablaufenden Reaktionen von NO mit Sauerstoff und Ascorbinsäure berücksichtigt:



Es wird vorausgesetzt, dass das NONOat auch unter Sauerstoffeinfluss zunächst zwei  $\text{NO}^{[89]}$  freisetzt. Das NO-Radikal kann nun entweder mit FNOCT erst zu dem bekannten Nitroxid und nach Reduktion zum Hydroxylamin reagieren (Reaktion 2 und 3) oder mit dem in der Lösung enthaltenen Sauerstoff (etwa 220  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ ) weitere Stickoxide bilden (Reaktion 15 und 16). Durch das so gebildete  $\text{NO}_2$ -Radikal kann eine Elektronentransferreaktion mit dem in der Lösung befindlichen Ascorbat

erfolgen, sodass neben  $\text{NO}_2^-$  ein Ascorbylradikal entsteht (Reaktion 14). Dieses könnte nach dem in Abbildung 5.28 beschriebenen Mechanismus mit NO zu weiteren Produkten reagieren. Die Reaktion von NO mit Sauerstoff ist insgesamt 3. Ordnung, 2. Ordnung in Bezug auf NO und 1. Ordnung in Bezug auf Sauerstoff. Dies könnte bedeuten, dass mit Erhöhung der NO-Konzentration die Geschwindigkeit dieser Reaktion im Gegensatz zur bimolekularen Reaktion von NO mit FNOCT stärker gesteigert wird. Das führt zu einem erhöhten NO-Verbrauch mit steigender NO-Konzentration. Dies zeigt sich, wenn der extrapolierte Endwert der Fluoreszenz  $I_\infty$  der einzelnen Messkurven aus Abbildung 5.29 gegen die Konzentration des NONOates aufgetragen wird, wie Abbildung 5.30 zeigt. Die Werte für  $I_\infty$  wurden durch Anpassung einer Exponentialfunktion an die entsprechende Kurve ermittelt.

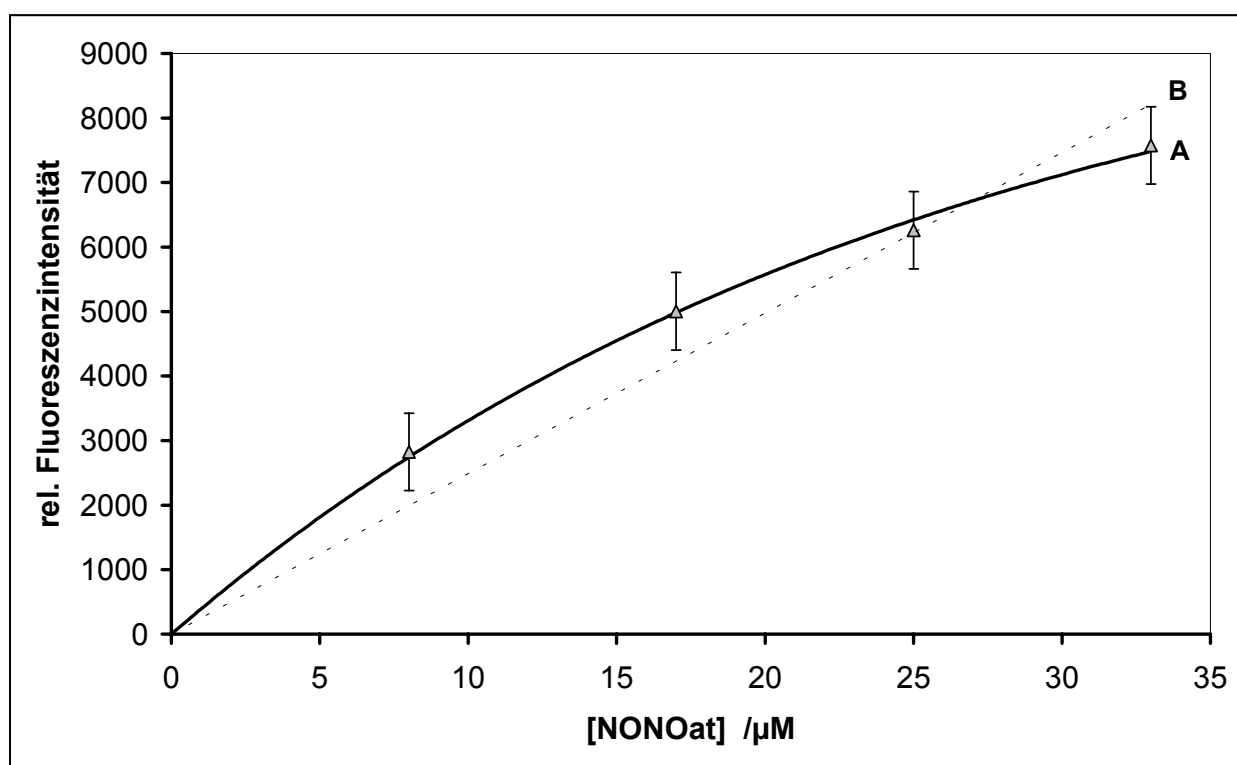


Abb. 5.30: Abhängigkeit zwischen der Konzentration des MAHMA/NO und der relativen Fluoreszenzintensität (Bedingungen wie in Abbildung 5.29). Bei den verwendeten Werten handelt es sich um die aus empirischen Exponentialfunktionen errechneten Daten für  $I_\infty$ . A) lineare Abhängigkeit, B) empirisch ermittelte Exponentialfunktion.

Der offensichtlich nicht-lineare Anstieg der Datenpunkte<sup>e</sup> stimmt mit der oben erwähnten Hypothese, dass mit Erhöhung der NO-Konzentration ein ebenfalls erhöhter NO-Verbrauch einhergeht, überein.

Der Versuch, an die Messdaten durch eine Simulation mit CKS (s.o.) eine mathematische Funktion anzupassen, der die Gleichungen 1, 2, 3, 14, 15, 16 und 17 zugrunde lagen, gelang hier wie auch in dem Experiment mit PAPA/NO (Kapitel 5.3.1) nur unzureichend. Eine Begründung hierfür ist, dass in dieser Berechnung noch mehr Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen, als in dem zuvor diskutierten einfacheren Reaktionssystem mit PAPA/NO ohne Sauerstoff und Ascorbinsäure.

Aus den in Abbildung 5.29 dargestellten Kurven kann jedoch auch bei dieser komplizierteren Reaktionsfolge die Halbwertszeit des NONOates empirisch abgeschätzt werden: Wie in Kapitel 5.3.1 wurde der Endwert der Fluoreszenzintensität, berechnet aus der zugrundeliegenden Exponentialfunktion ( $I_{t \rightarrow \infty}$ ) halbiert und die Zeit, nach der der Wert  $I_{t \rightarrow \infty}/2$  erreicht war, von der Zeitskala in Abbildung 5.29 abgelesen. Die Werte für die so ermittelte Halbwertszeit liegen mit 4.7 min (Kurve B) bis 3.5 min (Kurve E) bei 25°C etwas über dem für MAHMA/NO angegebenen Literaturwert von 3 min bei 25°C<sup>[89]</sup>. Somit scheint sich die Anwesenheit von Sauerstoff und Ascorbinsäure möglicherweise leicht geschwindigkeitshemmend auf den Aufbau der Fluoreszenz auszuwirken. Trotzdem kann somit auch in solchen, an biologische Gegebenheiten angelehnten, Systemen näherungsweise die Halbwertszeit der NO-Freisetzung aus einem NONOat bestimmt werden.

---

<sup>e</sup> Für die Abschätzung der Messgenauigkeit wurden die beobachteten Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten nach Ablauf der Reaktion (Erreichen des Plateauwertes) aus einer Vielzahl unabhängiger Einzelmessungen gemittelt. Dieser abgeschätzte statistische Messfehler beträgt etwa 600 Einheiten der relativen Fluoreszenzintensität.

### 5.3.4 Untersuchung des Zerfalls von Angelis Salz

Im Rahmen der Untersuchung der NO-Bildung mittels Superoxiddismutase (SOD) aus dem Nitroxid anion  $\text{NO}^-$  wurde die Zersetzung von Angelis Salz, dem Dinatriumsalz der Oxosalpetrigen Säure, ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ) beobachtet. Dieses setzt neben  $\text{NO}^-$  und  $\text{NO}_2^-$  auch NO und weitere radikalische und nicht-radikalische Spezies nach dem in Abbildung 5.31 beschriebenen Schema<sup>[98,112,113]</sup> frei.

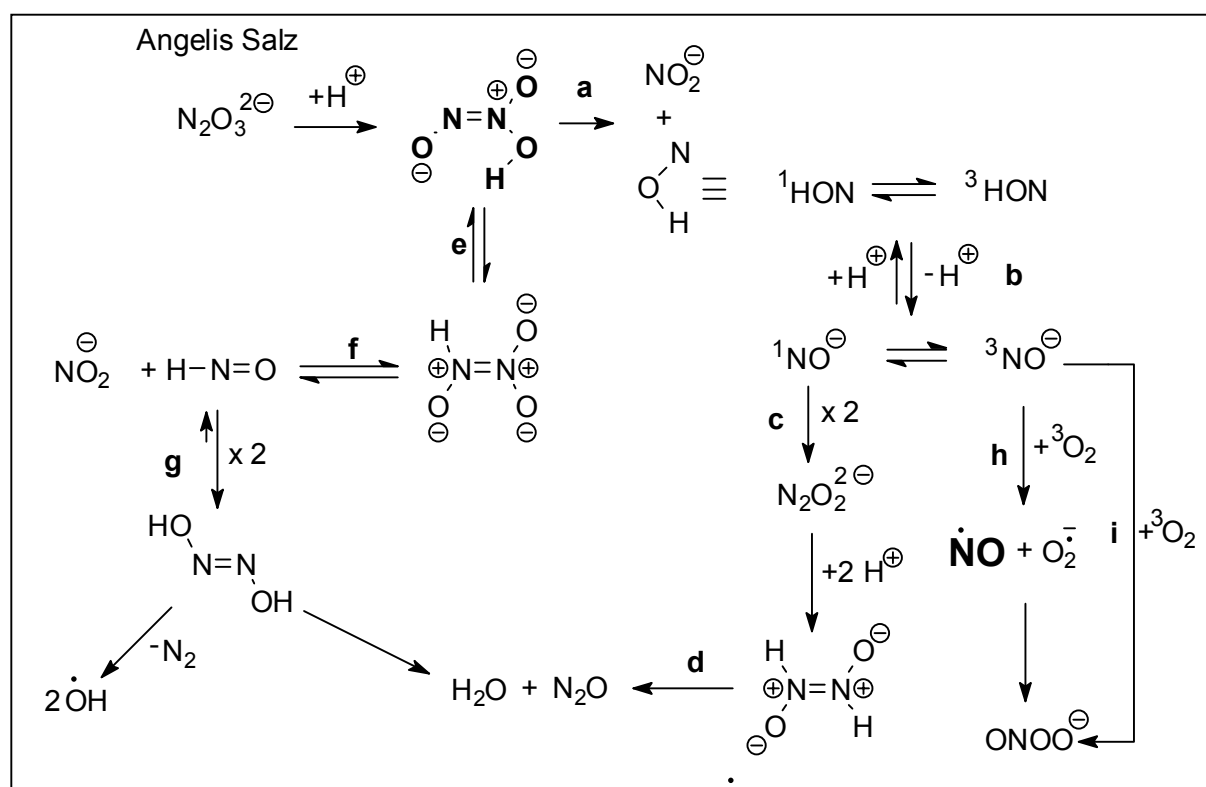


Abb. 5.31: Hypothetischer Zerfall von Angelis Salz. Beschreibung zu den Reaktionen im nachfolgenden Text.

Das  $\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$ -Ion wird zunächst protoniert. Die monoprotonierte Form könnte auf Reaktionsweg **a** neben Nitrit auch die O-protonierte Form des Nitroxylanions ( $\text{HON}$ ) liefern, welches sowohl im Singulett- als auch im Triplettzustand vorliegen kann. Der Triplett-Zustand ist laut quantenchemischer Rechnungen der Grundzustand. Nach Deprotonierung wird hieraus  $\text{NO}^-$  (**b**), ebenfalls im Singulett- oder Triplettzustand (der wiederum dann der Grundzustand ist), freigesetzt. Singulett- $\text{NO}^-$  wird dann über Weg **c** zu Bishyposalpetriger Säure umgesetzt, die sich schnell zu  $\text{N}_2\text{O}$  (Lachgas) und Wasser zersetzt (**d**). Zu diesen Verbindungen reagiert das protonierte Angelis

Salz auch über Weg **e** ab. Hier wird zunächst Hyposalpetrige Säure gebildet (**f**), die wiederum sehr schnell zur Bishyposalpetrigen Säure dimerisiert (**g**). Triplett-NO<sup>-</sup> kann mit anwesendem (Triplett)-Sauerstoff über Weg **h** zu NO und Superoxid reagieren<sup>[98]</sup>. Diese Verbindungen können dann Peroxynitrit bilden. Diese Reaktion kann auch über Weg **i** verlaufen.

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sind Weg **a** und die Wege **e** und **f**, die zur Bildung protonierter Nitroxylanionen führen und Weg **h**, auf welchem NO gebildet wird, interessant. Die Wege **a**, **e** und **f** sollten ohne Einfluss von Sauerstoff ablaufen können und in wässriger Lösung NO<sup>-</sup> im Triplett- und/oder Singulettzustand liefern. In Anwesenheit von Sauerstoff sind die Reaktionen **h** und **i** möglich. Liefere Reaktion **h** ab, so stünde NO für die Bildung des Nitroxids **7-NO** zur Verfügung. Eine Freisetzung von NO sollte ohne Anwesenheit von Sauerstoff nicht stattfinden und es sollte kein Anstieg der FNOCT-NO-Fluoreszenz erfolgen können, vorausgesetzt, dass FNOCT **7** nicht direkt mit NO<sup>-</sup> reagiert. Experimente zum Zerfall des Angelis Salz zeigen jedoch, dass auch unter Anoxie das fluoreszierende NO-Addukt **7-NOH** gebildet wird (siehe Abbildung 5.32).

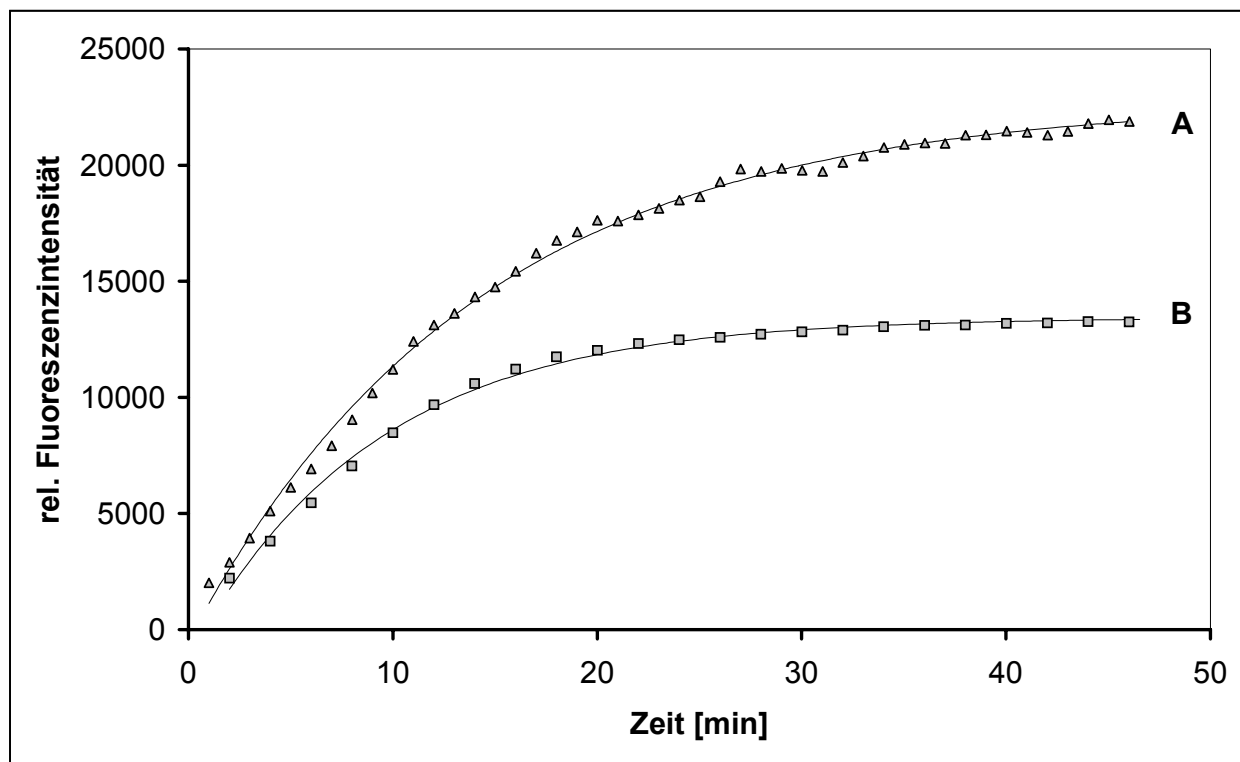
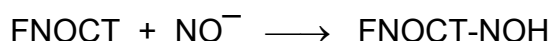


Abb. 5.32: Detektion von Produkten aus dem Zerfall von Angelis Salz. Beobachtung der Hydroxylamin-Bildung aus FNOCT 7 unter anaeroben (A) und aeroben Bedingungen (B). Zusammensetzung des Versuchsansatzes für beide Proben: 50  $\mu\text{M}$  FNOCT, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure, 10 % Pluronic in Phosphatpuffer pH = 7.25. Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Angelis Salz.

In Abwesenheit von Sauerstoff (Kurve A) wurden höhere Fluoreszenzintensitäten beobachtet als bei Anwesenheit von  $\text{O}_2$  (Kurve B). Dies ist naheliegend, da  $\text{NO}^-$  schnell mit Sauerstoff zu Peroxynitrit reagiert, d. h. sowohl bei NO-Bildung als auch bei direkter Reaktion von  $\text{NO}^-$  mit FNOCT würde eine erniedrigte Fluoreszenz zu beobachten sein. Aus diesem Experiment liesse sich folgern, dass FNOCT direkt mit  $\text{NO}^-$  zum FNOCT-NOH reagieren kann:



Dies würde dann bedeuten, dass FNOCT nicht spezifisch für das NO-Radikal ist. Die bei „sauerstofffreier“ Reaktionslösung gemessene Kurve kann allerdings auch widerspruchsfrei erklärt werden, wenn man annimmt, dass durch Spuren von Sauerstoff oder durch eine Nebenreaktion etwas NO gebildet wird. Eine geringfügige



NO-Bildung unter diesen Bedingungen wurde durch Messungen mit einer NO-Elektrode bestätigt.<sup>[114]</sup> Durch diese geringen Mengen NO wird das NO<sup>-</sup>-Addukt **7-NO<sup>-</sup>** aus FNOCT **7** gebildet. Da NO<sup>-</sup> ein Elektron auf ein Radikal übertragen kann,<sup>[115,116]</sup> würde diese Elektronentransferreaktion dann zur Reduktion von **7-NO<sup>•</sup>** unter Freisetzung eines NO-Radikals führen, d. h. im Sinne einer Kettenreaktion würde schliesslich sämtliches NO<sup>-</sup> zu NO<sup>•</sup> bzw. FNOCT-NOH umgewandelt werden. Die Reaktion ist in Abbildung 5.33 wiedergegeben.

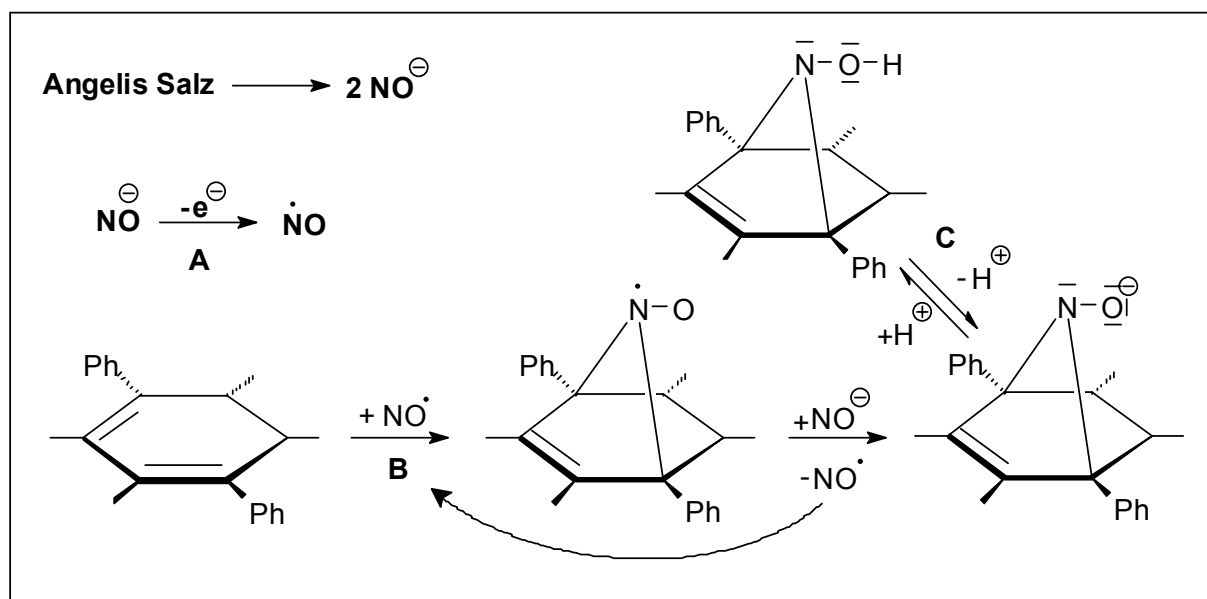


Abb. 5.33: A) Elektronentransfer von NO<sup>-</sup> auf das NO-Radikal. B) Durch Reaktion A gebildetes NO reagiert mit FNOCT **7**; ein Nitroxidradikal wird gebildet, welches zum Anion reduziert wird. C) Reaktion zum Hydroxylamin **7-NOH**.

Die alternative Erklärung ist, dass FNOCT direkt mit NO<sup>-</sup> im Sinne einer cheletropen Reaktion zum (deprotonierten) FNOCT-NOH reagiert. Dies würde bedeuten, dass FNOCT nicht spezifisch für das NO-Radikal ist.

Untersuchungen mit der NO-Elektrode zeigten, dass die Anwesenheit von Ascorbinsäure ebenfalls zu einer geringfügigen Freisetzung von NO aus Angelis Salz führt.<sup>[114]</sup> Diese Mengen können möglicherweise sowohl unter hypoxischen (hierzu liegen aus technischen Gründen keine Messungen vor) wie auch unter normoxischen Bedingungen die Bildung von NO und damit nach Reaktion mit FNOCT zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führen. Dies würde für den in Abbildung 5.34 beschriebenen Mechanismus sprechen. Um einen Einfluss der Ascorbinsäure

auszuschliessen, wurden die Messungen in Abwesenheit von Ascorbinsäure wiederholt. Die Kurven sind in Abbildung 5.34 aufgeführt.

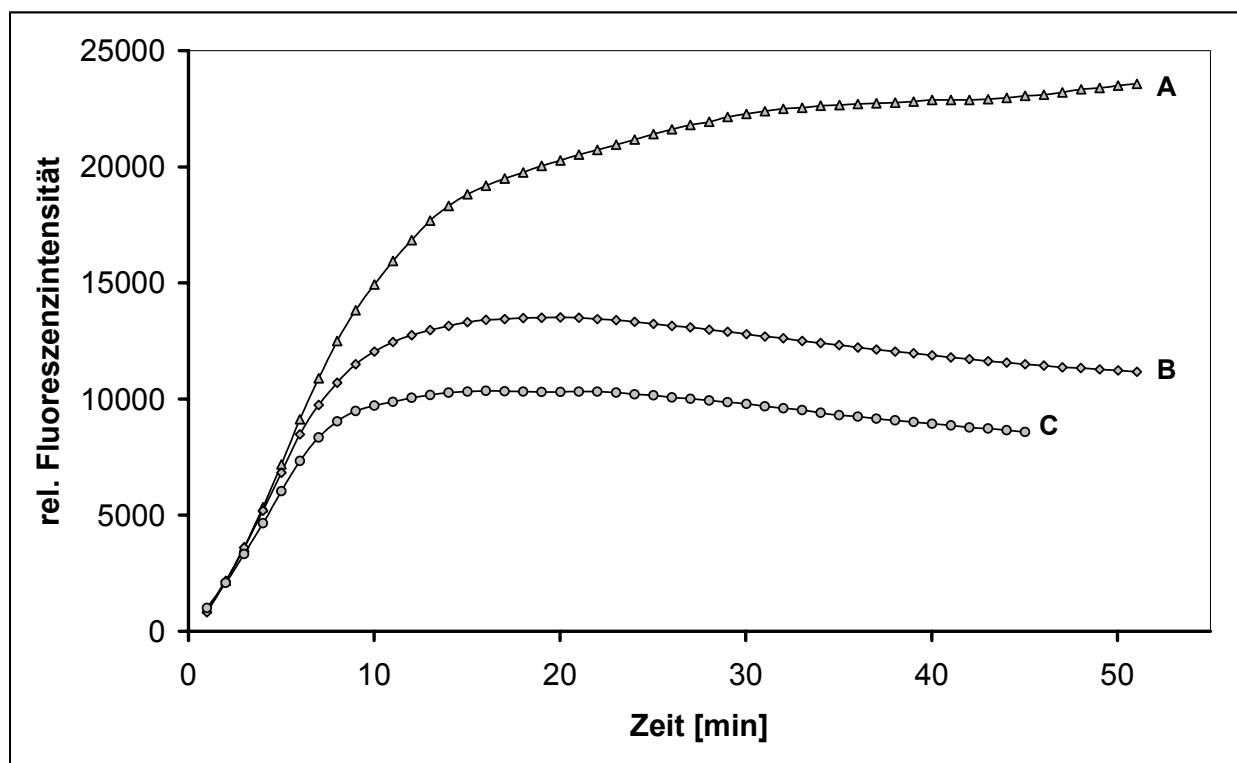


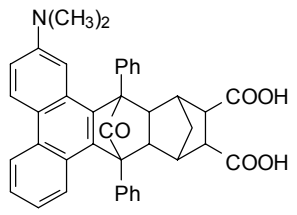
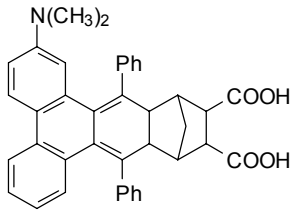
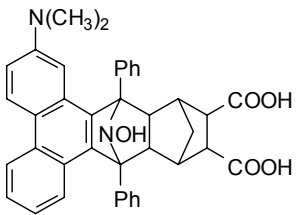
Abb. 5.34: Detektion von Produkten aus dem Zerfall von Angelis Salz in Abwesenheit von Reduktionsmitteln. Beobachtung der Hydroxylaminbildung aus FNOCT 7 in Abwesenheit von Sauerstoff (A), mit 21 % Sauerstoff (luftgesättigt) (B) und sauerstoffgesättigt (C). Sonstige Bedingungen: 50  $\mu$ M FNOCT und 10 % Pluronic in Phosphatpuffer pH = 7.25. Zugabe von je 200  $\mu$ M Angelis Salz.

Die Messungen zeigen, dass auch ohne Einfluss von Ascorbinsäure ein Anstieg der Fluoreszenz bis zum erwarteten Maximalwert zu beobachten ist. Dies deutet darauf hin, dass das freigesetzte Nitroxidanion durch FNOCT ebenso wie NO abgefangen wird. Allerdings kann aufgrund der vorliegenden Messungen nicht eindeutig entschieden werden, welcher der oben beschriebenen Mechanismen tatsächlich abläuft. Demnach können auch keine eindeutigen Angaben über die Spezifität des FNOCT-Farbstoffes gemacht werden.

## 5.4 Zusammenfassung

Um den Fluoreszenzmarker FNOCT **7** für Anwender in Biologie, Physiologie und Chemie interessanter zu machen, wurden die Eigenschaften der Verbindung auf der Grundlage der bereits vorhandenen Arbeiten<sup>[20,63]</sup> weitergehend untersucht. Dabei wurde neben den Fluoreszenzeigenschaften vor allem die Wirkung des jeweiligen Lösungsmittels auf die Fluoreszenz, die Spezifität des Nachweisreagenz, seine Lagerstabilität und Toxizität gegen biologische Systeme untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse der Fluoreszenzeigenschaften von FNOCT **7**, seiner Ketonvorstufe **6** und des Reaktionsproduktes mit NO, dem Hydroxylamin **7-NOH** sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Verbindung	Lösungsmittel	$\lambda_{\text{exc}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]
 Keton <b>6</b>	Tetrahydrofuran	340 390	455 455
 FNOCT <b>7</b>	Phosphatpuffer pH = 7.2	470	580
 Hydroxylamin <b>7-NOH</b>	Phosphatpuffer pH = 7.2	320 380	458 458

Die Wahl des Lösungsmittels kann sich entscheidend auf die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen auswirken. Da sich FNOCT und Hydroxylamin

nur mässig in Phosphatpuffer lösen, sollte ein Lösungsvermittler, z. B. Pluronic F127 zugefügt werden, der jedoch Auswirkungen auf das Fluoreszenzspektrum haben kann. Als beste Zusatzmenge erwies sich in den Experimenten ein Anteil von 10 % Pluronic. Die Untersuchung der Lagerstabilität ergab, dass FNOCT unter Inertgasatmosphäre nach 7 Tagen bei Zimmertemperatur noch keine Qualitätsverluste aufweist. Die Toxizität der Substanz wurde mittels LDH-Test untersucht. Für die bei Versuchen in biologischen Systemen relevanten Konzentrationen von bis zu 50  $\mu\text{M}$  zeigten von vier unterschiedlichen Zelltypen nur TIBS-Makrophagen eine leicht erhöhte Empfindlichkeit gegen FNOCT.

Um die variable Eignung des FNOCT-System auch für Anwendungen in chemischen Systemen zu zeigen, wurde zunächst der Zerfall des kommerziell erhältlichen NONOats PAPA/NO untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Geschwindigkeitskonstante der NO-Freisetzung nicht durch ein einfaches kinetisches Modell bestimmt werden kann. Die Halbwertszeit kann jedoch aus den Messkurven gut abgeschätzt werden und entspricht mit 75 min etwa dem Literaturwert von 77 min bei 25°C.<sup>[89]</sup> Wichtig ist, dass der Einfluss von Sauerstoff auf den Abfang von NO untersucht werden kann, was durch die NO-Elektrode nicht möglich ist, da hier nicht unter Ausschluss von Luft gearbeitet werden kann.

Ein zusätzlicher Beweis für die Reaktion von Superoxid mit NO konnte durch Untersuchung der Reaktivität von Tetrahydrobiopterin, einem Cofaktor der NO-Synthase erbracht werden. Dabei wurde auch der Beweis geliefert, dass Tetrahydrobiopterin Sauerstoff zu Superoxid reduziert. Gleichzeitig konnte eine Reaktion des FNOCT mit Superoxid ausgeschlossen werden.

In früheren Arbeiten wurde bei Verwendung von FNOCT den Messlösungen häufig Ascorbinsäure als Reduktionsmittel beigegeben. Kinetische Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten jedoch, dass Ascorbinsäure in Gegenwart von Sauerstoff mit Stickstoffmonoxid reagieren kann, was zu Veränderungen des Intensität-Zeit-Verlaufs führt. Diese Ergebnisse wurden durch zusätzliche Messungen mit der NO-Elektrode bestätigt. Als besseres Reduktionsmittel erwies sich Glutathion, dessen Wirkung auf den NO-Spiegel nur sehr gering ist. Für die Reaktion von Ascorbinsäure mit NO in Gegenwart von Sauerstoff wurde ein hypothetischer Mechanismus

aufgestellt, der jedoch im Rahmen dieser Arbeit und mit den verwendeten Methoden nicht eindeutig überprüft werden konnte. Zusätzlich wurde unter Verwendung von MAHMA/NO eine Messreihe zur Untersuchung dieses NONOates und seiner Halbwertszeit in Abhängigkeit von Sauerstoff und Ascorbinsäure angeschlossen. So konnte auch unter Ablauf dieser Parallelreaktionen in guter Näherung die Halbwertszeit von MAHMA/NO (gefunden:  $t_{1/2} = 4 \text{ min}$ , Literatur:<sup>[89]</sup>  $t_{1/2} = 3 \text{ min}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ) experimentell bestimmt werden.

Im Rahmen der Untersuchung der Spezifität von FNOCT wurde der Zerfall von Angelis Salz (Abgabe des Nitroxidanions) gemessen. Dabei zeigte sich, dass anscheinend entweder Angelis Salz neben  $\text{NO}^-$  auch noch NO abgibt, oder dass FNOCT in der Lage ist, auch mit  $\text{NO}^-$  zu einem fluoreszierenden Produkt zu reagieren. Mit den verwendeten Untersuchungsmethoden konnte aber nicht zweifelsfrei geklärt werden, um welche Reaktionsvariante es sich handelt. Diese Experimente stellen einerseits natürlich die Spezifität des Farbstoffes in Frage, andererseits könnten sich aber auch interessante Anwendungen aus diesen Versuchen ergeben. In jedem Fall sollten sowohl der Mechanismus des Zerfalls von Angelis Salz wie auch die Spezifität von FNOCT weitergehend erforscht werden.

## 6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass fluoreszierende o-Chinodimethane (FNOCT's) auch in chemischen Systemen ihre Einsatzmöglichkeiten finden. So konnte der Zerfall der kommerziell erhältlichen N-Diazeniumdiolate (NONOate) MAHMA/NO, PAPA/NO und Spermin/NO reproduzierbar untersucht werden. Dies macht den Farbstoff FNOCT zu einem sehr nützlichen Instrument bei der Untersuchung neuer N-Diazeniumdiolate. Somit steht zur Charakterisierung der Eigenschaften (z.B. Bestimmung der Halbwertszeit und Menge des freigesetzten Stickstoffmonoxids) dieser Verbindungen neben der UV/Vis-Spektroskopie eine weitere Methode zur Verfügung, die sich durch die direkte Erfassung des NO auszeichnet.

Interessante Ergebnisse lieferte vor allem die Untersuchung der Umsetzung von NO mit Ascorbinsäure. Der Verlauf dieser Reaktion konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer NO-Elektrode überprüft. Weitere Untersuchungen z.B. über die Beschaffenheit des Produktes der Reaktion könnten wichtige Hinweise auf den bislang nur postulierten Mechanismus der Reaktion liefern. In einer Pufferlösung aus D<sub>2</sub>O sollte nach Einleitung von Stickstoffmonoxidgas in sauerstoffhaltiger Lösung und in Abwesenheit von Sauerstoff die Umsetzung der Ascorbinsäure NMR-spektroskopisch zu verfolgen sein. So kann auch ein möglicher Einfluss der verwendeten NONOate festgestellt und gegebenenfalls vermieden werden.

Weiterführende Experimente sind sicherlich auch in Hinblick auf die vermutete Reaktivität von FNOCT mit dem Nitroxyl-Anion vorteilhaft, die bei der Untersuchung des Zerfalls von Angelis Salz festgestellt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit führte keines der durchgeführten Experimente zu einer sicheren Aussage bezüglich der Selektivität des Farbstoffes zwischen NO-Radikal und Anion. Auch die NMR-Spektroskopie kann hier keine Ergebnisse erbringen, da in beiden Fällen das gleiche Hydroxylamin als Endprodukt erwartet wird. Hier sind sicherlich weitere Untersuchungen zum Zerfall von Angelis Salz mit anderen Methoden unumgänglich.

Aus der Vielzahl der Anwendungen für fluoreszierende o-Chinodimethane in biologischen und chemischen Systemen ergeben sich auch in Hinblick auf die Synthese weiterer Derivate noch eine Vielzahl von Zukunftsperspektiven. Beispielsweise wäre eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit eine Option, die die Anwendung vereinfachen würde, da dies den Zusatz von Lösungsvermittlern wie Pluronic F127 überflüssig machen würde, der die Experimente mit FNOCT in der beschriebenen Weise beeinflusst. Ein Ansatz hierzu ist die Einführung wasserlöslicher Gruppen in die Aromaten am Diphenyl-1,3-propan-2-on, welches zur Bildung eines Phencyclons mit Phenanthrenchinon führt. Relevante Gruppen sind z. B. Hydroxy-Gruppen, Amino-Gruppen oder Sulfonsäure-Gruppen. Abbildung 6.1 zeigt mögliche Strukturen.

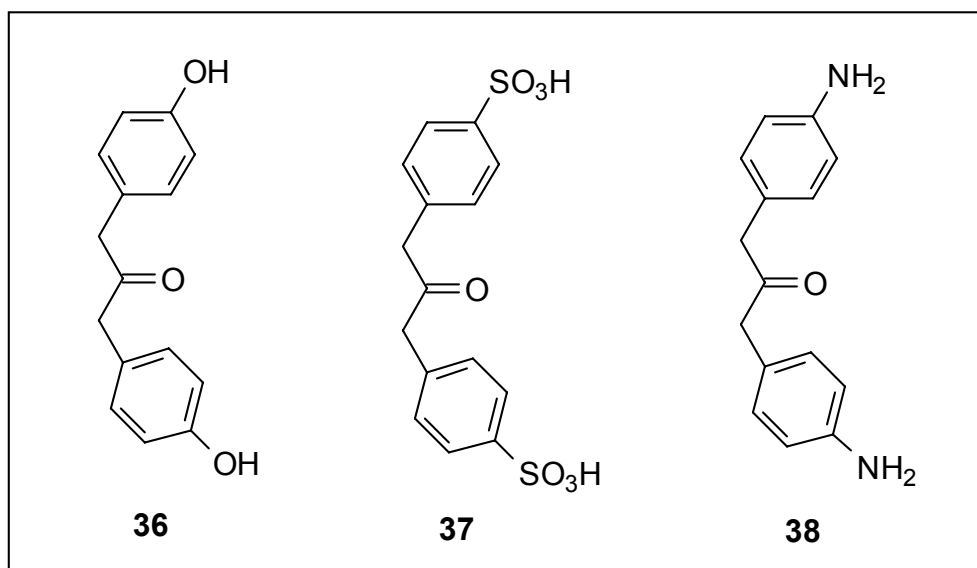


Abb. 6.1: Dihydroxy-, Disulfonsäure- und Diamino-Derivat des Diphenyl-1,3-propan-2-on

In der Literatur sind einige Derivate des Diphenyl-1,3-propan-2-on bekannt. Für Verbindung **36** existieren viele Synthesevorschriften.<sup>[111,112,113,114]</sup> Hier sind jedoch keine Kondensationsreaktionen zur Bildung eines Cyclons oder Cyclopentadienons beschrieben. Verbindung **37** ist in der Literatur nicht beschrieben. Eine Alternative hierzu könnte aber die Verbindung 1,3-Di-[p-(methylsulfonyl)phenyl]-propan-2-on (**39**) darstellen. Deren Wasserlöslichkeit ist sicherlich geringer als die der Verbindung **37**, beeinflusst aber möglicherweise trotzdem das Lösungsverhalten. Darstellung und Kondensation sind beschrieben.<sup>[121]</sup> Abbildung 6.2 zeigt Verbindung **39**.

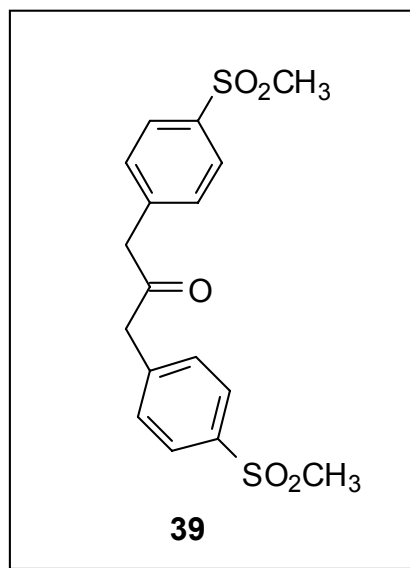


Abb. 6.2: 1,3-Di-[p-(methylsulfonyl)phenyl]-propan2-on (**39**) wird durch Oxidation eines Thioethers hergestellt.

Das Diamin **38** ist ebenfalls nicht in der Literatur bekannt. Es existieren jedoch Vorschriften zur Darstellung von 1,3-bis-(4-Nitrophenyl)-aceton (**40**).<sup>[122,123]</sup> Diese Verbindung könnte durch Reduktion in ein Amin überführt werden. Gegebenenfalls könnte auch zunächst die ebenfalls beschriebene Kondensation<sup>[124]</sup> durchgeführt werden, an die sich dann eine Reduktion anschliessen würde. Verbindung **38** und **40** sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

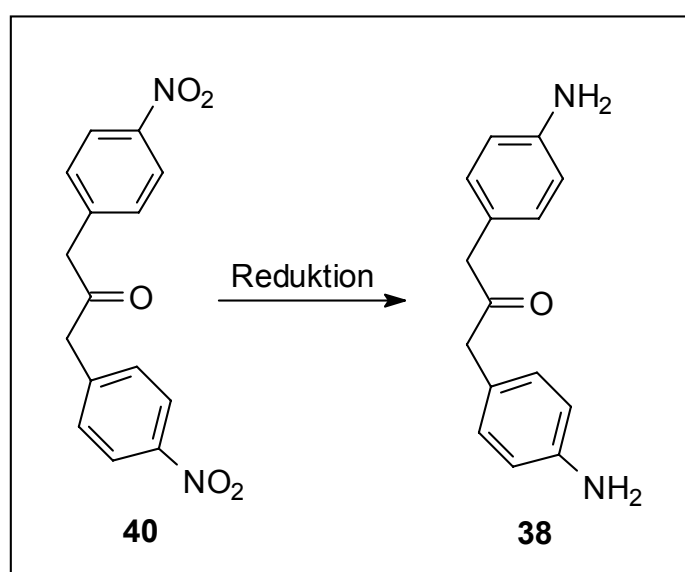
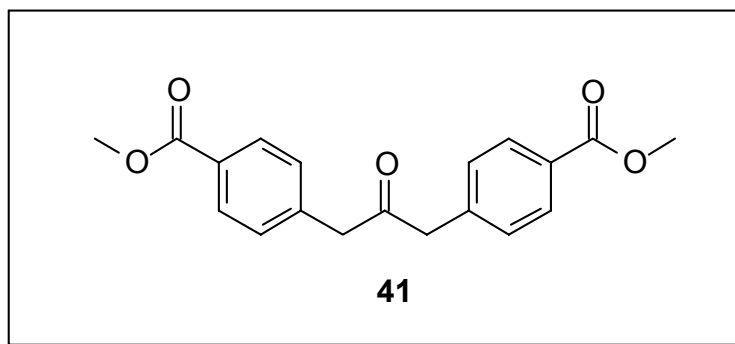


Abb. 6.3: 1,3-bis-(4-Nitrophenyl)-aceton (**40**) kann möglicherweise durch Reduktion in 1,3-bis-(4-Aminophenyl)-aceton (**38**) überführt werden.



Um den zellgängigen Acetoxymethylester des FNOCT zu modifizieren, bietet sich eine Substitution der Aromaten des Diphenyl-1,3-propan-2-on an. In der Literatur ist die Darstellung eines Dimethylesters **41** beschrieben<sup>[125,126]</sup> (Abbildung 6.4).



*Abb. 6.4: 1,3-bis-[4-(Methoxycarbonyl)phenyl]-2-propanon (**41**) als Vorstufe für einen Acetoxymethylester*

Gelänge für diese Verbindung eine zur Umsetzung des Dimethylesters der Norbornendicarbonsäure analoge Reaktion zu einem Diacetoxymethylester, so würde ein auf diese Weise modifiziertes FNOCT-Molekül vier gleiche Esterfunktionen tragen. Diese könnten das Durchdringen der Zellwand durch den Farbstoff erleichtern, das heisst, grössere Mengen des Farbstoffes können aufgenommen werden. Dazu kommt noch, dass die Verbindung nach Spaltung der Esterfunktionen vierfach negativ geladen ist und ein Austritt des Farbstoffes aus der Zelle in noch höherem Maß verhindert würde. Das denkbare FNOCT-Derivat sollte dann die in Abbildung 6.5 angegebene Struktur **42** besitzen.

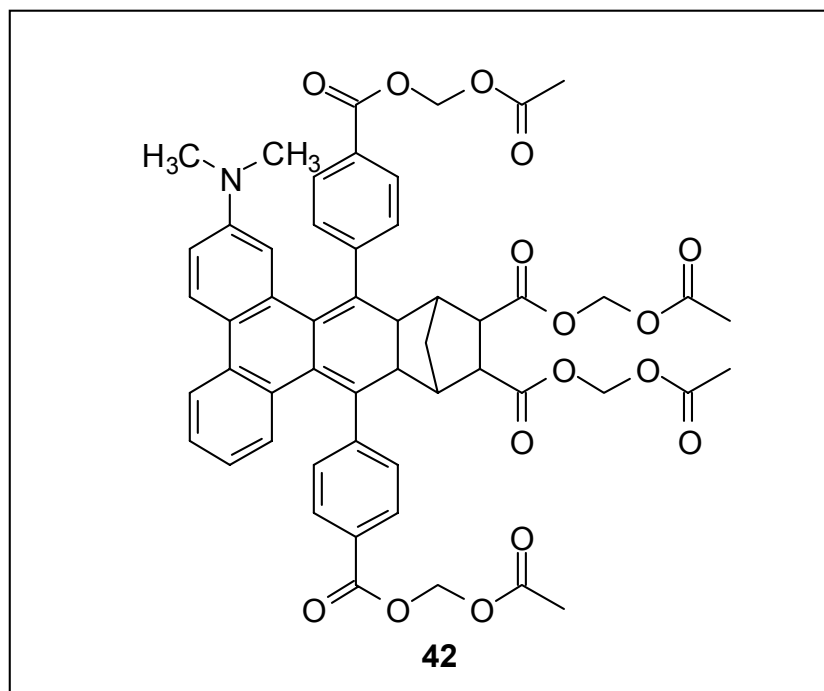


Abb. 6.6: Denkbares FNOCT-Derivat für die Untersuchung biologischer Systeme.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Arbeitstechnik

#### 7.1.1 Arbeiten unter Schutzgas

Für diese Arbeit waren Synthesen und Untersuchungen unter Schutzgas notwendig, da einige der hergestellten oder verwendeten Chemikalien feuchtigkeits- bzw. sauerstoffempfindlich waren. Als Schutzgas für die Synthesen wurde Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) der Firma Messer Griesheim eingesetzt. Dieses wurde einer festinstallierten Trocknungsanlage entnommen, die jeweils 50 cm lange Säulen mit Kaliumhydroxid, Phosphor(V)oxid und Kieselgel enthielt. Die verwendeten Apparaturen wurden mit der Ölpumpe (1.0 Pa) evakuiert, mit einem Heissluftfön ausgeheizt und nach dem Abkühlen mit Argon geflutet.

Einige der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden unter Stickstoff 2.5 (Reinheit 99.5 %) von Messer Griesheim) als Schutzgas durchgeführt. Hierzu wurden die verwendeten Pufferlösungen ca. 1 h in einer speziellen Begasungsapparatur mit Bodenfritte mit Stickstoff 2.5 gespült. Anschliessend wurden sie unter Schutzgas entnommen und in eine Küvette überführt.

#### 7.1.2 Verwendete Chemikalien

##### Trocknung und Reinigung der Lösungsmittel

**Tetrahydrofuran** und **Toluol** wurden über Natrium zum Sieden erhitzt. Als Indikator wurde *p*-Phenylbenzophenon zugesetzt. Die Bildung des blauviolett-farbenen Ketylradikals<sup>[127]</sup> zeigt die vollständige Entfernung des Wassers an. Anschliessend wurden die Lösungsmittel in Vorratsgefässe abdestilliert. Für die Trocknung von Tetrahydrofuran (p.a.-Ware der Firma J.T. Baker) wurde eine spezielle Apparatur verwendet, in der sich das Lösungsmittel ständig unter Argon 5.0 befand.

**Ethanol** wurde je Liter mit 7 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester versetzt und 2 h zum Sieden erhitzt.<sup>[128]</sup> Anschliessend wurde unter Schutzgas in ein Vorratsgefäss abdestilliert.

**Dimethylformamid** wurde durch Destillation und anschliessende Filtration über neutralem Aluminiumoxid (Woelm) getrocknet.

Alle Lösungsmittel einschliesslich des deuterierten Tetrahydrofurans wurden unter Schutzgas (Argon 5.0) aufbewahrt. Sauerstofffreie Lösungsmittel wurden durch 30 minütiges Spülen mit Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) oder Stickstoff 2.5 (Reinheit 99.5 %) der Firma Messer Griessheim erhalten.

### Spezielle Chemikalien

Bei allen für die Synthesen verwendeten Chemikalien und Lösungsmitteln handelte es sich um p.a.-Ware. Die wichtigsten Edukte mit den zugehörigen Herstellern sind im folgenden tabellarisch aufgeführt.

Substanz	Hersteller	Reinheit/Gehalt
1,3-Diphenyl-2-propanon	Acros	99 %
Acetylchlorid	Merk	---
Aktivkohle	Acros	---
Chlorbenzol	Fluka	98 %
Chlorgas	Messer	---
Dicyclopentadien	Fluka	~ 90 %
Ethylencarbonat	Fluka	99 %
Formaldehyd-Lösung	Aldrich	37 %
Fumarsäuredimethylester	Aldrich	97 %
Hydroxylaminhydrochlorid	Aldrich	99 %
Kaliumhydroxid (Plättchen)	sds	85 %
Natriumborhydrid	Merk	96 %
Natriumhydrogensulfid	Riedel de Haen	techn.
Natriumhydroxid	Roth	99 %

Natriumdithionid	Fluka	85 %
n-Heptan	sds	p.a.
Palladium/Aktivkohle	Fluka	---
Paraformaldehyd	Fluka	---
Phenanthren-9,10-chinon	Fluka	> 90 %
Sauerstoffgas	Messer	---
Tetrachlormethan	Fluka	p.a.
Zinkstaub	Fluka	---
Zinn-II-chlorid Dihydrat	Acros	97 %

### 7.1.3 Besondere Apparaturen und Laborgeräte

Für die kinetischen Messungen mittels Fluoreszenzspektroskopie wurden temperierbare Küvetten (1mL) aus Quarzglas der Firma Hellma verwendet. Sie wurden über einen Thermostaten der Firma Julabo mit VE-Wasser auf 25°C temperiert.

Für Bestrahlungsversuche im kleinen Masstab (ca. 10 mg) wurden Suprasil-NMR-Röhrchen eingesetzt.

Für die Photolysen grösseren Masstabs (ca. 50 mg) wurde ein spezielles Reaktionsgefäß konzipiert (Skizze siehe Kap. 3), der in den photochemischen Reaktor „Rayonet Photochemical Reactor RPR-100“ der Firma The Southern New England Ultraviolet Company eingebracht werden konnte. Als Kühlmittel diente Ethanol in einem Kryostaten der Firma Julabo. Die Bestrahlung erfolgte mit UV-Lampen (Rayonet Photochemical Reactor Lamp-300 nm, UV-B-Lampen, mittelwellig). Es wurden 16 Lampen (288 x 16 mm) zu je 8 Watt verwendet.

Die Chlorierung des Ethylencarbonat erfolgte in einem Photoreaktor, welcher der Literatur<sup>[73]</sup> nachempfunden war (Beschreibung siehe dort).

### 7.1.4 Instrumentelle Analytik

#### Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten Bruker AMX-300 und DRX-500 bzw. Varian Gemini-200 aufgenommen. Die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren erfolgte mit dem DRX-500-Spektrometer. Alle chemischen Verschiebungen sind in ppm-Einheiten angegeben. Als interner Standard für die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren dienten die undeuterten Anteile der deuterierten Lösungsmittel. Um die Zuordnung der Signale einzelner Verbindungen zu erleichtern, wurden zusätzlich zu den  $^{13}\text{C}$ -Spektren DEPT-135- und DEPT-95-Spektren am AMX-300- oder DRX-500-Spektrometer aufgenommen.

#### Infrarot-Spektroskopie (IR)

IR-spektroskopische Untersuchungen erfolgten an einem FT-IR-Spektrometer der Firma BIO RAD, Modell FTS 135. Gemessen wurde mit einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  über 32 Scans. Es wurden KBr-Verreibungen der jeweiligen Probe für die Messung hergestellt.

#### Elementaranalytik

Die CHN-Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Essen an einem Analysator der Firma Carlo Erba (Elemental Analyzer Modell 1106) angefertigt.

#### UV-Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektrogramme wurden an dem Gerät Cary 300 Bio der Firma Varian aufgenommen. Da dieses Spektrometer ein Zweistrahlgerät ist, konnten die Probe und der entsprechende Leerwert gleichzeitig gemessen werden. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem zugehörigen Scan-Programm. Vor den Messungen wurde eine Basislinie aufgenommen, die automatisch durch das Programm vom gemessenen Spektrum abgezogen wurde. Die Spektren umfassten einen Wellenlängenbereich zwischen 250 nm und 500 – 700 nm.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente wurden an dem Spektrometer FL 3095 der Firma J&M Analytische Mess-und Regeltechnik GmbH durchgeführt. Für alle Spektren wurden Quarzküvetten verwendet. Aufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Programm „FL 3095-Fluoroscanner“. Vor jeder Messung wurde eine automatische Hintergrundkorrektur vorgenommen. Alle Spektren wurden – soweit nicht anders vermerkt – mit einer Integrationszeit von 1000 ms aufgezeichnet.

### **Massenspektrometrie (MS)**

Zur Aufnahme von Massenspektren stand ein Sektorfeld-Massenspektrometer VG Pro-Spec 3000 der Firma Fisons Instruments zur Verfügung. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoß bei 70 eV.

### **Schmelzpunkte**

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte mit dem Gerät 9100 der Firma Electrothermal oder an einem Heiztischmikroskop der Firma Reichert. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

### **Detektion von Stickstoffmonoxid**

Stickstoffmonoxid wurde mit der NO-Elektrode ISO-NO der Firma WPI detektiert. Die Messkurven wurden mittels x,y-Schreiber aufgezeichnet und anschliessend mit Hilfe einer Kalibrierungskurve in Konzentrations-Zeit-Diagramme umgerechnet.

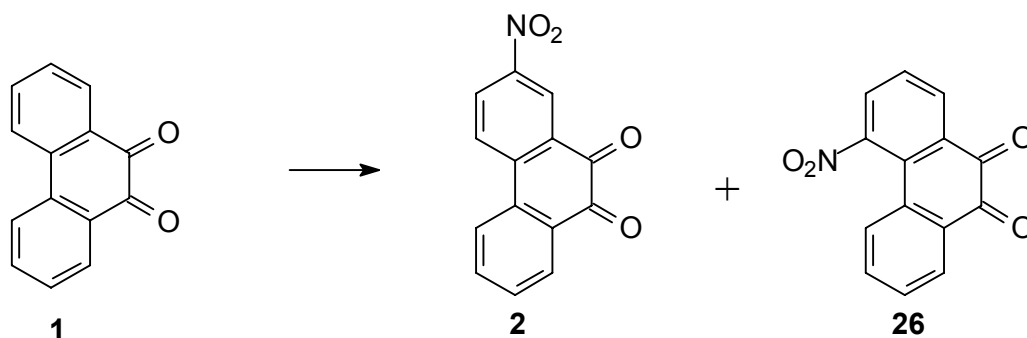
### **pH-Wert-Bestimmung**

Die pH-Werte der Pufferlösungen wurden mit dem pH-Meter 766 Calimetric der Firma Knick bei 25°C bestimmt.

## 7.2 Optimierung und Neusynthese der phenanthren-haltigen o-chinoiden Fluoreszenzmarker

### 7.2.1 Darstellung von 2- und 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26**)<sup>[65]</sup>

(Die Darstellung beider Produkte wird zusammen beschrieben, da beide Produkte in der selben Stufe entstehen.)



30.0 g (144 mmol) Phenanthren-9,10-chinon wurden in einem 2 L –Zweihalskolben mit Magnetrührstab mit 900 mL Salpetersäure (65 %) versetzt. Dann wurde ein Rückflußkühler mit Ableitung in den Abzug aufgesetzt und ein Gaseinleitungsrohr, welches in die Reaktionsmischung reicht, eingebaut. Das Reaktionsgemisch wurde 40 min lang unter Rückfluß gekocht. Während dieser Zeitspanne wurde Argon (oder Stickstoff) durch die Lösung geleitet, um die nitrosen Gase auszutreiben. Nach dem Abkühlen der Lösung, wurde die Reaktionslösung in 1000 mL Wasser vorsichtig eingegossen, woraufhin sich ein gelber Niederschlag bildete, der abgesaugt und mit Wasser gründlich nachgewaschen wurde. Das Filtrat wurde neutralisiert und entsorgt, der Filtrerrückstand wurde an der Luft getrocknet und dann in 1000 mL Ethanol ca. 2 h lang ausgekocht. Hierbei geht ein Teil des Feststoffes in Lösung. Nach dem Abkühlen wurde der verbliebene Feststoff abgesaugt. Er bestand hauptsächlich aus 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon und wurde mit Eisessig (ca. 1200 mL) umkristallisiert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne



einrotiert. Der Rückstand bestand hauptsächlich aus 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon. Dieser wurde aus ca. 1000 mL 50%iger Essigsäure umkristallisiert.

### Ausbeuten:

2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**): 13.9 g (55.0 mmol)  $\equiv$  42 % (Lit.<sup>[65]</sup>: 65 %)

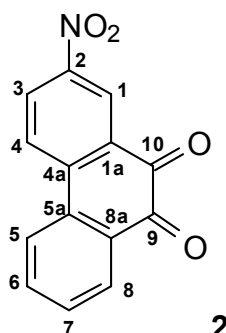
4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26**): 11.4 g (45.0 mmol)  $\equiv$  35 % (Lit.<sup>[65]</sup>: 35 %)

### Schmelzpunkte:

2-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**2**): 263°C (Lit.<sup>[65]</sup>: 258-260°C)

4-Nitrophenanthren-9,10-chinon (**26**): 176-178°C (Lit.<sup>[65]</sup>: 179-180°C)

### Charakterisierung von 2:



### <sup>1</sup>H-NMR:

(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

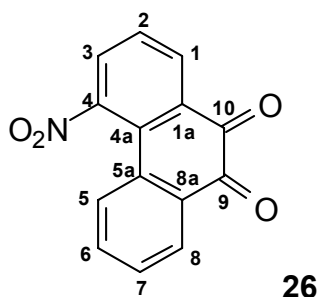
$\delta$  = **8.62** [d, 1H;  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.55$  Hz; 1-H],  $\delta$  = **8.57** [d, 1H,  $^3J(3\text{-H}) = 8.90$  Hz, 4-H],  $\delta$  = **8.44** [dd, 1H,  $^3J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.80$  Hz,  $^4J(4\text{-H}, 1\text{-H}) = 2.55$  Hz 3-H],  $\delta$  = **8.38** [d, 1H,  $^3J(6\text{-H}) = 7.90$  Hz, 5-H],  $\delta$  = **8.01** [d, 1H,  $^3J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 7.80$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.55$  Hz, 8-H],  $\delta$  = **7.84** [t, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 7.90$  Hz,  $^4J(8\text{-H}) = 1.50$  Hz, 6-H],  $\delta$  = **7.65** [t, 1H,  $^3J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.60$  Hz,  $^4J(5\text{-H}) = 0.90$  Hz 7-H]

**$^{13}\text{C}$ -NMR:**(DMSO- $d_6$ , 125 MHz)

$\delta = 177.6, 176.9$  (C-9, C-10);  $\delta = 147.3$  (C-2),  $\delta = 140.7$  (C-4a);  $\delta = 133.2, 132.4, 132.1$  (C-1a, C-5a, C-8a);  $\delta = 135.2, 130.9, 129.2, 128.4, 126.2, 125.7, 122.7$  (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8)

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3115, 3094 \text{ cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu} = 1672 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Chinon</sub>,  $\tilde{\nu} = 1523 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\tilde{\nu} = 1345 \text{ cm}^{-1}$  (NO<sub>2</sub>),  $\tilde{\nu} = 859 \text{ cm}^{-1}$  (C-H).

**Charakterisierung von 26:** **$^1\text{H}$ -NMR:**(DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

$\delta = 8.26$  [dd, 1H,  $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 7.55 \text{ Hz}$ ;  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.55 \text{ Hz}$ ; 3-H],  $\delta = 8.15$  [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H}) = 7.85 \text{ Hz}$ , 8-H],  $\delta = 8.10$  [dd, 1H,  $^3J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 7.60 \text{ Hz}$ ,  $^4J(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.60 \text{ Hz}$  1-H],  $\delta = 7.72 - 7.78$  [m, 2H, 6-H, 7-H],  $\delta = 7.63$  [t, 1H,  $^3J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.55 \text{ Hz}$ , 2-H],  $\delta = 7.46$  [d, 1H,  $^3J(6\text{-H}) = 7.90 \text{ Hz}$ , 5-H]

 **$^{13}\text{C}$ -NMR:**(DMSO- $d_6$ , 125 MHz)

$\delta = 177.9; 177.3$  (C-9, C-10),  $\delta = 148.4$  (C-4),  $\delta = 135.0; 131.6; 130.7; 129.9; 129.9; 129.5; 126.2$  (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-8),  $\delta = 133.0; 131.9; 130.5; 127.5$  (C-4a, C-5a, C-1a, C-8a)

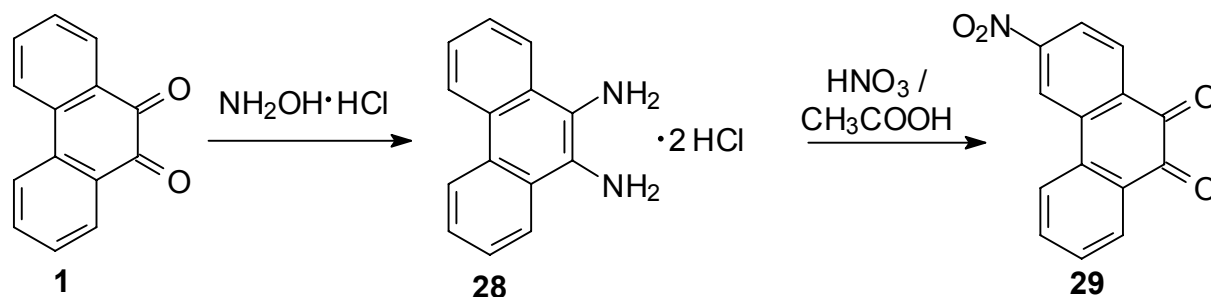
**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3116\text{--}3024\text{ cm}^{-1}$  ( $=\text{C-H}$ ),  $\tilde{\nu} = 1680\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=O}$ )<sub>Chinon</sub>,  $\tilde{\nu} = 1591\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=C}$ ),  
 $\tilde{\nu} = 1525\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NO}_2$ )

**EA:**  $M = 253\text{ g/mol}$

Ber.: **C:** 66.41 %    **H:** 2.79 %    **N:** 5.53 %

Gef.: **C:** 66.58 %    **H:** 2.73 %    **N:** 5.66 %

**7.2.2 Synthese von 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon (29)<sup>[77]</sup>****7.2.2.1 Synthese von 9,10-Diaminophenanthren (28)<sup>[78]</sup>**

20.0 g (96.2 mmol) 9,10-Phenanthrenchinon und 20.0 g (288 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid wurden in einem 1 L-Zweihalskolben mit Rückflusskühler in 400 mL Ethanol suspendiert. Anschliessend wurde mit 8.00 g Natriumhydroxid ein pH-Wert von 5 eingestellt. Dabei verfärbt sich das Reaktionsgemisch von gelb nach grün. Dann wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde heiss filtriert, um ausgefallene anorganische Salze abzutrennen. Das Filtrat wurde mit 100 g Zinn-(II)-chloriddihydrat in 250 mL konzentrierter Salzsäure versetzt, worauf ein hellgrau-silbriger Feststoff ausfiel. Dieser wurde über eine Nutsche abgesaugt. Anschliessend wurde das verbliebene Filtrat nochmals mit 30.0 g Zinn-(II)-chloriddihydrat versetzt, worauf noch eine weitere Feststofffraktion ausfiel, die abgesaugt wurde. Die Fraktionen wurden vereinigt und 3 Tage an der Ölpumpe gründlich getrocknet. Eine Reinigung und Charakterisierung entfiel, da der Feststoff laut Literatur<sup>[78]</sup> direkt umgesetzt wurde. Bis zum Einsatz in die Folgestufe wurde der Feststoff unter Argon

aufbewahrt, da sich gezeigt hatte, dass er sich an der Luft langsam unter Farbwechsel nach grün zersetzt.

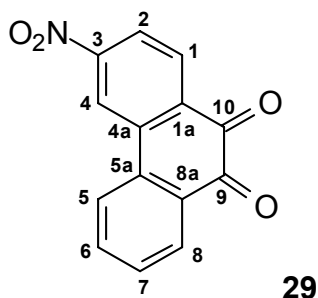
#### 7.2.2.2 Acetylierung und Nitrierung von 9,10-Diaminophenanthren<sup>[77]</sup>

In einem 500 mL-Kolben mit Rückflusskühler wurden 10.1 g (48,0 mmol) 9,10-Diaminophenanthren mit 6.15 g Natriumacetat versetzt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Kupferpulver wurden 35 mL Essigsäureanhydrid und 70 mL Eisessig zugesetzt und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Anschliessend wurden ungelöste Bestandteile durch Filtration abgetrennt. Dabei wurde das Filtrat direkt in der Nitrierungsapparatur bestehend aus einem 1-L-Dreihalskolben mit Rückflusskühler mit aufgesetztem Gasableitungsrohr und Tropftrichter aufgefangen, um Ausbeuteverluste gering zu halten. Die Apparatur befand sich aus Sicherheitsgründen hinter einer Plexiglas-Schutzwand, da eine Explosionsfähigkeit des Reaktionsgemisches nicht ausgeschlossen werden konnte. In dem Tropftrichter wurden 40 mL 100 %iger Salpetersäure mit einer Spatelspitze Kupferpulver versetzt. Die Säure färbte sich sofort grün. Dann wurde sie langsam unter Rühren zur noch warmen Reaktionslösung getropft. Nach dem etwa die Hälfte der Säure unter heftiger Reaktion zugegeben worden war, erfolgte die Bildung grosser Mengen nitroser Gase. Nach dem Abkühlen der rot-braunen Reaktionslösung und dem Abzug der nitrosen Gase wurde die Lösung vorsichtig in 400 mL VE-Wasser gegossen. Dies führte zum sofortigen Ausfallen eines gelben Feststoffes, der über eine Nutsche abgesaugt wurde. Der Feststoff wurde mit Wasser nachgewaschen und an der Luft getrocknet. Dann wurde er in 400 mL Ethanol 2 h gekocht, wobei er sich vollständig löste. Beim Abkühlen fiel ein kleiner Teil des Feststoffes wieder aus. Dieser wurde in etwa 130 mL Eisessig umkristallisiert.

**Ausbeute:** 2.89 g (11.4 mmol) 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon  $\equiv$  24 % bezogen auf 9,10-Diaminophenanthren (Lit.<sup>[77]</sup>: 20 %)

**Schmp.:** 230°C (Lit.<sup>[65]</sup>: 267°C)

## Charakterisierung von 29:

**<sup>1</sup>H-NMR:**(DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta = 8.85$  [d, 1H;  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.55$  Hz; 4-H],  $\delta = 8.42\text{--}8.26$  [m, 3H, 1-H, 2-H, 5-H],  $\delta = 8.16$  [d, 1H,  $^3J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 7.80$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.55$  Hz, 8-H],  $\delta = 7.86$  [t, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 7.90$  Hz,  $^4J(8\text{-H}) = 1.50$  Hz, 6-H, 7-H],  $\delta = 7.62$  [t, 1H,  $^3J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.60$  Hz,  $^4J(5\text{-H}) = 0.90$  Hz 7-H, 6-H]

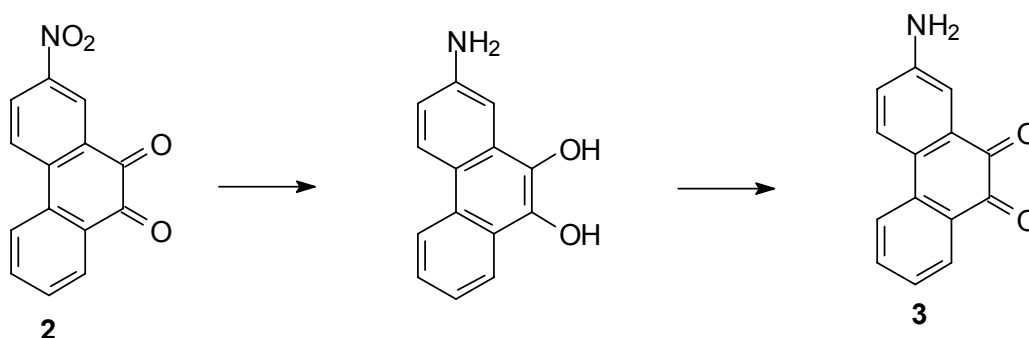
**<sup>13</sup>C-NMR:**(DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)

$\delta = 177.6, 177.4$  (C-9, C-10);  $\delta = 151.3$  (C-3);  $\delta = 136.7, 135.4, 133.39, 131.8$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a),  $\delta = 135.3, 130.3, 130.2, 129.1, 125.1, 123.3, 119.2$  (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8)

**MS:** (70 eV)

$m/z$  (%): 253 (25) [ $M^+$ ], 225 (100) [ $M^+ - \text{CO}$ ], 179 (36) [ $M^+ - \text{CO}, -\text{NO}_2$ ], 151 (91) [ $M^+ - \text{CO}, -\text{NO}_2, -\text{CO}$ ].

### 7.2.3 Syntheseoptimierung für 2-Aminophenanthren-9,10-chinon (**3**)<sup>[66]</sup>



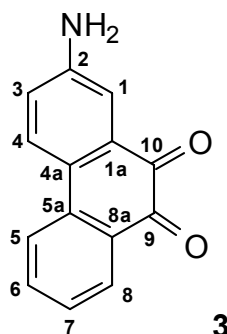
12.5 g (50.0 mmol) 2-Nitrophenanthren-9,10-chinon wurden in 625 mL einer 2 M Natronlauge in einem offenen Kolben suspendiert. Anschließend wurde die Suspension portionsweise mit 38.0 g (218 mmol) festem Natriumdithionit (85 %) versetzt, wobei eine Farbänderung von gelb nach dunkelgrün zu beobachten war. Anschließend wurde unter Rühren auf dem Wasserbad innerhalb von ca. 5 min auf 50°C erwärmt, um die Reaktion zu vervollständigen. An der Oberfläche bildete sich ein schwarzvioletter Niederschlag. Die Lösung wurde mit 750 mL VE-Wasser verdünnt und anschließend schnell über eine Nutsche abgesaugt. Der Filtrückstand wurde mit weiteren 312 mL alkalischer Dithionit-Lösung (Konzentrationen wie zuvor!) nachgewaschen, um bereits ausgefallenes Produkt wieder zu lösen. Das Filtrat wurde mit 375 mL Wasser verdünnt und mit dem zuvor gewonnenen Filtrat vereinigt. Anschließend wurde 2 h Luft durch die Lösung geleitet. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet.

Von dem Produkt wurde ein Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Toluol:Ethylacetat 3:1 auf Kieselgel 60) angefertigt, um die Reinheit zu überprüfen. Da kein Nitroprodukt mehr zu erkennen war, konnte auf eine Umkristallisation aus Ethanol verzichtet werden.

**Ausbeute:** 8.35 g (37.4 mmol)  $\equiv$  75 % 2-Aminophenanthren-9,10-chinon (Lit.:<sup>[66]</sup> 82-85 %)

**Schmp.:** Sintern bei 206 °C, bis 320 °C nicht klar geschmolzen (Lit.<sup>[66]</sup>: 205-210 °C, bis 300 °C nicht klar geschmolzen)

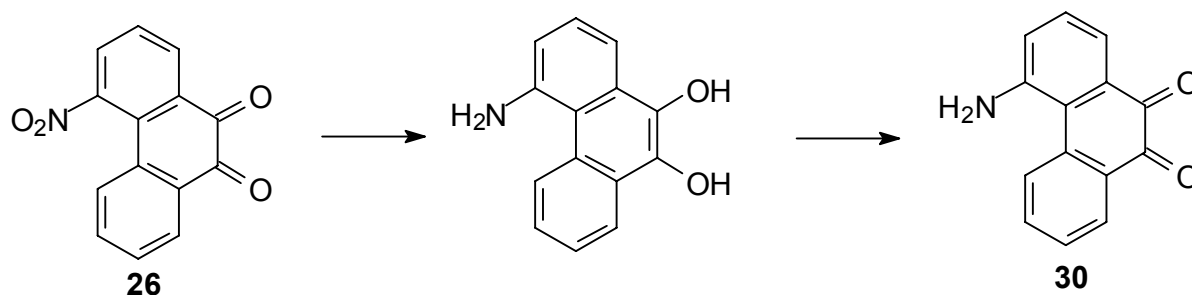
## Charakterisierung von 3:

<sup>1</sup>H-NMR:(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

$\delta = 7.98$  [d, 1H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 8.2$  Hz, 4-H];  $\delta = 7.90$  [d, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 6.9$  Hz, 5-H];  $\delta = 7.86$  [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.5$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.3$  Hz, 8-H];  $\delta = 7.65$  [dt, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 6.9$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.3$  Hz, 6-H];  $\delta = 7.29$  [t, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.5$  Hz];  $\delta = 7.18$  [d, 1H,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.6$  Hz, 1-H];  $\delta = 6.91$  [dd, 1H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.6$  Hz, 3-H];  $\delta = 5.84$  [br, s, 2H, NH<sub>2</sub>].

## IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3426, 3354, 3230$  cm<sup>-1</sup> (N-H),  $\tilde{\nu} = 3065$  cm<sup>-1</sup> (=C-H),  $\tilde{\nu} = 1670$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Chinon</sub>,  
 $\tilde{\nu} = 1593$  cm<sup>-1</sup> (C=C)<sub>Chinon</sub>.

7.2.4 Synthese von 4-Aminophenanthren-9,10-chinon (9)<sup>[66]</sup>

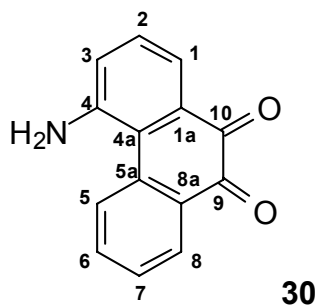
5.00 g (20.0 mmol) 4-Nitrophenanthren-9,10-chinon wurden unter Rühren mit 150 mL einer 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung versetzt. 3.30 g (44.6 mmol) Natrium-

hydrogensulfid wurden in 40 mL Wasser gelöst und der gelben Suspension zugesetzt, woraufhin sich diese schwarz verfärbte. Dann wurde die Reaktionsmischung ca. 1 h gerührt und anschließend in 1000 mL Wasser gegossen. Dieser Mischung wurde ein Löffelspartel Natriumhydrogencarbonat zugesetzt. Dann wurde ca. 1,5 h lang Luft in die Reaktionsmischung eingeleitet. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser nachgewaschen und getrocknet. Anschließend wurde aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 3.98 g (17.8 mmol) = 89 % (Lit.:<sup>[66]</sup> 90 %)

**Schmp.:** Sintern bei 210°C, bis 320°C nicht klar geschmolzen (Lit.:<sup>[66]</sup> Erweichung bei 207°C, bis 340°C nicht klar geschmolzen)

#### Charakterisierung von 30:



#### <sup>1</sup>H-NMR:

(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

$\delta$  = **8.54** [d, 1H, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 8.1 Hz, 5-H],  $\delta$  = **7.92** [dd, 1H, <sup>3</sup>J(7-H, 8-H) = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J(6-H, 8-H) = 1.5 Hz, 8-H],  $\delta$  = **7.72** [dt, 1H, <sup>3</sup>J(6-H, 7-H) = 7.1 Hz, <sup>4</sup>J(6-H, 8-H) = 1.3 Hz, 6-H],  $\delta$  = **7.39** [t, 1H, <sup>3</sup>J(6-H, 7-H) = 7.4 Hz, 7-H],  $\delta$  = **7.35-7.32** [m, 1H, 1-H]  $\delta$  = **7.20-7.18** [m, 2H, 2-H, 3-H]

#### <sup>13</sup>C-NMR:

(DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)

$\delta$  = **182.1, 182.0** (C-9, C-10),  $\delta$  = **147.9** (C-4),  $\delta$  = **137.6, 132.2, 130.7, 119.4** (C-8a, C-1a, C-5a, C-4a),  $\delta$  = **136.2, 129.73, 129.72, 127.8, 127.3, 126.2, 119.8** (C-6, C-2, C-8, C-7, C-5, C-3, C-1)

(Für die Zuordnung wurden zusätzlich <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-Korrelationsspektren verwendet.)



**IR(KBr):**

$\tilde{\nu} = 3417, 3348, 3230 \text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $\tilde{\nu} = 3066 \text{ cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu} = 1670 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Chinon</sub>,  
 $\tilde{\nu} = 1594 \text{ cm}^{-1}$  (C=C)<sub>Chinon</sub>

**EA:** M = 223 g/mol

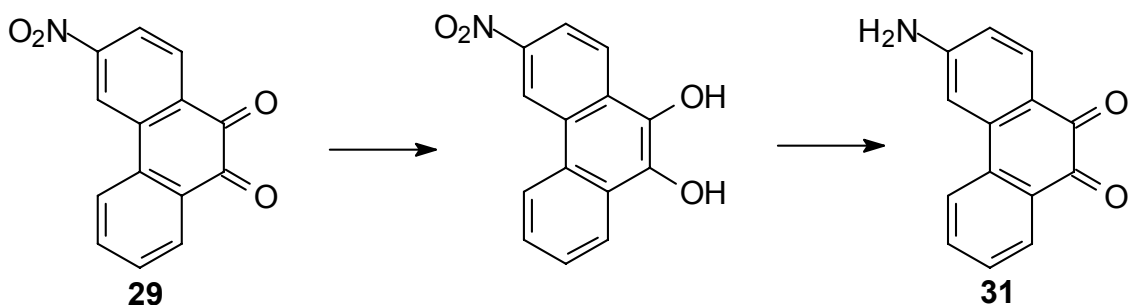
Ber.: **C:** 73.37 %    **H:** 4.06 %    **N:** 6.26 %

Gef.: **C:** 73.44 %    **H:** 3.90 %    **N:** 6.93 %

**MS:** (70 eV)

*m/z* (%): 223 (40) [ $M^+$ ], 195 (100) [ $M^+ - \text{CO}$ ], 167 (45) [ $M^+ - 2 \text{ CO}$ ]

### 7.2.5 Synthese von 3-Aminophenanthren-9,10-chinon (17)<sup>[78]</sup>



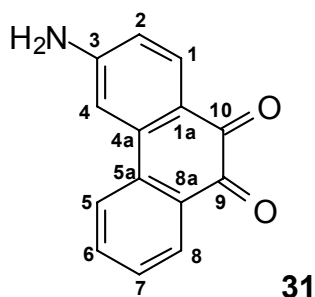
2.89 g (11.4 mmol) 3-Nitrophenanthren-9,10-chinon wurden in 110 mL einer 2 M Natriumhydroxid-Lösung suspendiert. Dann wurden 4.50 g (60.8 mmol) Natriumhydrogensulfid zugesetzt und die Reaktionsmischung auf dem Wasserbad auf 50°C erwärmt. Anschliessend wurde das Gemisch mit 500 mL VE-Wasser verdünnt und abgenutscht, um nicht umgesetzte Reste des Eduktes oder Verunreinigungen durch Phenanthrenchinon abzutrennen. Da an der Luft bereits Feststoff ausfiel, wurde ein weiteres Reduktionsgemisch aus 2.3 g Natriumhydrogensulfid in 55 mL 2 M Natriumhydroxid-Lösung hergestellt und über die Nutsche gegeben. Das Filtrat wurde mit 250 mL VE-Wasser versetzt. Beide Filtrate wurden getrennt voneinander mit Druckluft durchblasen, was zu starkem Schäumen führte. Dabei fiel ein dunkelbrauner Feststoff an. Die Feststoffe beider Lösungen wurden isoliert, auf ihre

Reinheit hin untersucht und anschliessend vereinigt. Wegen der geringen Menge an Produkt wurde auf eine Umkristallisation verzichtet.

**Ausbeute:** 1.46 g (6.54 mmol) 3-Aminophenanthren-9,10-chinon  $\equiv$  57 %  
(Lit.:<sup>[78]</sup> 85 %)

**Schmp.:** 248°C (Lit.:<sup>[78]</sup> 256°C). Das Produkt enthält Verunreinigungen.

### Charakterisierung von 31:



### <sup>1</sup>H-NMR:

(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

$\delta$  = **7.98** [d, 1H, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 7.9 Hz, 5-H],  $\delta$  = **7.97** [dd, 1H, <sup>3</sup>J(7-H, 8-H) = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J(6-H, 8-H) = 1.6 Hz, 8-H],  $\delta$  = **7.81** [d, 1H, <sup>3</sup>J(1-H, 2-H) = 8.6 Hz, 1-H],  $\delta$  = **7.76** [dt, 1H, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J(6-H, 8-H) = 1.6 Hz, 6-H],  $\delta$  = **7.52** [t, 1H, <sup>3</sup>J(7-H, 8-H) = 7.8 Hz, 7-H],  $\delta$  = **7.29** [d, 1H, <sup>4</sup>J(2-H, 4-H) = 2.1 Hz, 4-H],  $\delta$  = **6.85** [s, 2H, NH<sub>2</sub>],  $\delta$  = **6.35** [dd, 1H, <sup>3</sup>J(1-H, 2-H) = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J(2-H, 4-H) = 2.1 Hz, 2-H]

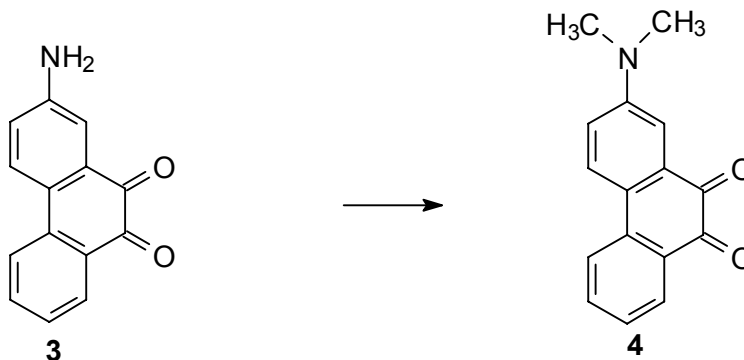
### <sup>13</sup>C-NMR:

Da in stark verdünnter Lösung gemessen wurde (ansonsten Bildung von Wasserstoffbrücken und damit stark verbreiterte Banden im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum), konnte kein auswertbares <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum aufgenommen werden.

**MS:** (70 eV)

*m/z* (%): 223 (30) [M<sup>+</sup>], 195 (100) [M<sup>+</sup>-CO]

### 7.2.6 Syntheseoptimierung für N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon (**4**)<sup>[67]</sup>



8.00 g (35.9 mmol) 2-Aminophenanthren-9,10-chinon und 100 mL trockenem Tetrahydrofuran wurden unter Eiskühlung und Rühren in einem Becherglas portionsweise mit 14.0 g (0.37 mol) gemörsertem Natriumborhydrid versetzt. Die entstandene Suspension wurde mit Hilfe einer abgebrochenen Pasteurpipette zu einer gerührten und gekühlten Lösung aus 100 mL Tetrahydrofuran 16.0 mL 3 M Schwefelsäure und 18.6 mL (0.25 mol) Formaldehyd-Lösung (37 %) (ebenfalls im Becherglas) gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, daß stets auch nicht gelöstes Natriumborhydrid mit in die Formaldehyd-Lösung mit eingetragen wurde. Die Innentemperatur lag dabei zwischen 10 und 30°C. Nachdem ca. die Hälfte der Suspension zugegeben worden war, wurden weitere 16.0 mL Schwefelsäure (3 M) zugesetzt. Dann wurde der Rest der Suspension überführt. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch mit 100 mL Wasser verdünnt und soviel festes Kaliumhydroxid zugegeben, bis die Reaktionsmischung stark alkalisch war. Das zuvor gelbe Reaktionsgemisch wurde hierbei dunkelblau. Während der Reaktion fiel Paraformaldehyd als weißer, viskoser Niederschlag aus und musste zunächst durch Filtration aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden.

Zur Isolierung des Produktes wurde Tetrahydrofuran am Rotationsverdampfer abgezogen und die verbleibende wässrige Lösung mehrfach mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Dann wurde vom Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Reinheit des Produktes wurde mittels Dünnschichtchromatographie

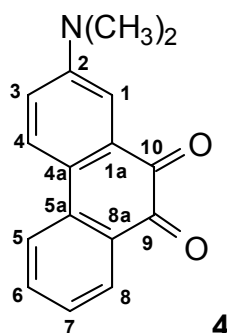
(Laufmittel: Toluol:Ethylacetat 3:1 auf Kieselgel 60) ermittelt. Da keine Nebenprodukte gefunden wurden, konnte das Produkt über eine kurze Säule mit 50 g Kieselgel 60 und einem Gemisch aus Toluol und Ethylacetat (3:1) gereinigt werden. Das gereinigte Produkt wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und an der Luft getrocknet.

**Ausbeute:** Rohausbeute: 7.50 g (29.9 mmol)  $\equiv$  83 %

Reinprodukt: 6.70 g (26.7 mmol)  $\equiv$  74 % N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon (Lit.<sup>[63]</sup>: 57 %)

**Schmp.:** 170 °C (Lit.<sup>[63]</sup>: 170 °C)

#### Charakterisierung von 4:



#### <sup>1</sup>H-NMR:

(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

$\delta$  = **7.99** [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.8$  Hz, 8-H],  $\delta$  = **7.67** [d, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.0$  Hz, 5-H],  $\delta$  = **7.66** [d, 1H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 8.9$  Hz, 4-H],  $\delta$  = **7.59** [dt, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.0$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.5$  Hz, 6-H],  $\delta$  = **7.24** [d, 1H,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 3.0$  Hz, 1-H],  $\delta$  = **7.22** [dt, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.8$  Hz,  $^3J(7\text{-H}, 5\text{-H}) = 1.0$  Hz, 7-H],  $\delta$  = **6.84** [dd, 1H,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.9$  Hz,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 3.0$  Hz, 3-H],  $\delta$  = **2.98** [s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)]

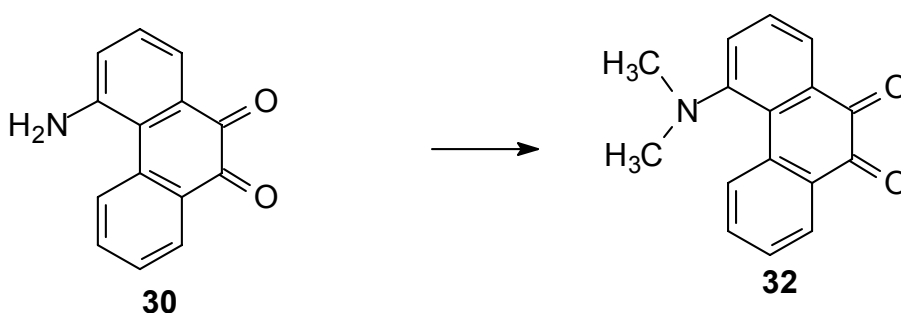
#### <sup>13</sup>C-NMR:

(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)

$\delta$  = **180.9, 180.8** (C-9, C-10),  $\delta$  = **150.4** (C-2),  $\delta$  = **137.4, 131.5, 129.5, 123.4** (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a),  $\delta$  = **135.9, 130.2, 127.2, 125.3, 122.6, 118.6, 112.3** (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8),  $\delta$  = **40.0** (CH<sub>3</sub>)

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3066 \text{ cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu} = 2890 \text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 2802 \text{ cm}^{-1}$  (N-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 1663 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Chinon</sub>,  $\tilde{\nu} = 1594 \text{ cm}^{-1}$  (C=C)<sub>Chinon</sub>

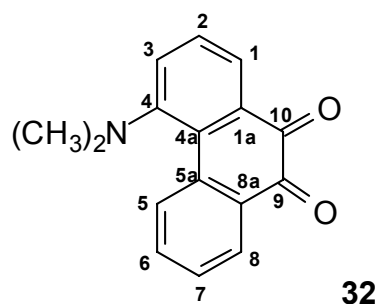
**7.2.7 Synthese von N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon****(32)<sup>[67]</sup>**

Zunächst wurde eine gekühlte Suspension aus 4.61 g (20.6 mmol) 4-Aminophenanthren-9,10-chinon und 8.50 g (0.22 mol) Natriumborhydrid in 60 mL Tetrahydrofuran hergestellt. Diese wurde zu einer gerührten und gekühlten Lösung aus 8 mL 3 M Schwefelsäure und 10 mL (0.13 mol) Formaldehydlösung (37 %) in weiteren 60 mL Tetrahydrofuran gegeben. Hierzu wurde eine abgebrochene Pasteurpipette verwendet, um sicher zu stellen, daß auch immer ein Teil des nicht gelösten Natriumborhydrids in die schwefelsaure Formaldehydlösung eingetragen wurde. Die Reaktionstemperatur lag zwischen 10 und 30°C. Nachdem ca. die Hälfte der Suspension zugeben worden war, musste mit weiteren 8 mL 3 M Schwefelsäure noch einmal angesäuert werden. Dann erfolgte die Zugabe der restlichen Suspension. Da das Reaktionsgemisch zwischenzeitlich nicht mehr rührfähig war, musste Tetrahydrofuran zugesetzt werden, bis das Gemisch wieder rührbar wurde. Die Mischung wurde noch 15 min bei Zimmertemperatur gerührt und schliesslich mit ca. 60 mL Wasser und Kaliumhydroxid versetzt, bis sie stark alkalisch reagierte. Zur Reinigung wurde die Reaktionsmischung mehrfach und gründlich mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden vereinigt, über Nacht über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 4.18 g (16.7 mmol) = 81 %

**Schmp.:** 118°C

**Charakterisierung von 32:**



**<sup>1</sup>H-NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

$\delta = 8.99$  [d, 1H,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.1$  Hz, 3-H],  $\delta = 8.02$  [dd, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 7.7$  Hz,  $^4J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.5$  Hz, 5-H],  $\delta = 7.79$  [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.5$  Hz,  $^3J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.4$  Hz, 8-H],  $\delta = 7.62$  [dt, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.4$  Hz,  $^4J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.6$  Hz, 7-H],  $\delta = 7.38\text{-}7.29$  [m, 3H, 1-H, 2-H, 6-H],  $\delta = 2.75$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>]

**<sup>13</sup>C-NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)

$\delta = 182.7, 182.5$  (C-9, C-10),  $\delta = 152.3$  (C-4),  $\delta = 137.4, 132.4, 130.5, 127.1$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a),  $\delta = 135.6, 129.6, 129.5, 128.3, 127.7, 125.9, 123.5$  (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-8)

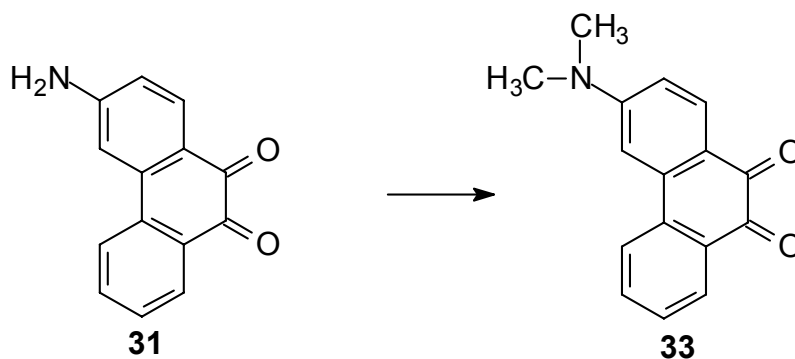
**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3071, 3005$  cm<sup>-1</sup> (=C-H),  $\tilde{\nu} = 2941$  cm<sup>-1</sup> (-C-H),  $\tilde{\nu} = 2792$  cm<sup>-1</sup> (N-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 1684$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Chinon</sub>,  $\tilde{\nu} = 1595$  cm<sup>-1</sup> (C=C)<sub>Chinon</sub>

**EA:** M = 251 g/mol

Ber.: C: 76.48 %    H: 5.21 %    N: 5.57 %

Gef.: C: 76.31 %    H: 5.55 %    N: 5.33 %

**7.2.8 Synthese von N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-chinon****(33)<sup>[67]</sup>**

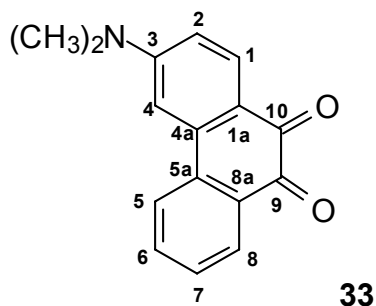
0.27 g (1.21 mmol) 3-Aminophenanthren-9,10-chinon wurden unter Eiskühlung zunächst in 3.50 mL Tetrahydrofuran gelöst und dann portionsweise mit 0.47 g (12.2 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Diese Suspension wurde mittels einer abgebrochenen Pasteurpipette zu einer gerührten und gekühlten Mischung aus 3.50 mL Tetrahydrofuran mit 0.54 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 M) und 0.62 mL (8.06 mmol) Formaldehyd gegeben. Dabei wurde unter heftigem Schäumen Wasserstoffgas freigesetzt. Nachdem etwa ein Drittel der Amin-Suspension zugesetzt worden war, wurde mit weiteren 0.54 mL der Schwefelsäure angesäuert. Dies wurde nach Zugabe des 2. Drittels der Suspension wiederholt. Anschliessend wurden zunächst 2 mL Tetrahydrofuran, dann 3.50 mL VE-Wasser und festes Kaliumhydroxid zugesetzt, bis ein stark alkalisches Milieu entstanden war. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne abgezogen und der Feststoff anschliessend in Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wurde mehrfach mit Wasser gereinigt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschliessend mit Chloroform gewaschen. Alle organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Ausbeute des Rohproduktes: 177 mg (0.71 mmol) = 59 %.

Zur Reinigung des Produktgemisches (etwa 5 Fraktionen, bestimmt durch dünnschichtchromatographische Analyse) wurde eine säulenchromatographische Trennung über Kieselgel 60 durchgeführt (100 g Kieselgel 60). Nach zahlreichen Versuchen (es wurden unterschiedliche Lösungsmittelgemische ausprobiert) erwies sich reines Ethylacetat als bestes Laufmittel. Hierzu wurden 141 mg des Produktgemisches eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte eine violette Fraktion (R<sub>f</sub> = 0.35) abgetrennt werden.

**Ausbeute:** Aus 141 mg (0.56 mmol) des Produktgemisches konnten 82 mg (0.16 mmol) an N,N-Dimethyl-3-aminophenanthren-9,10-chinon gewonnen werden. Ausbeute: 29 %.

**Schmp.:** bei ca. 225°C beginnende Zersetzung.

**Charakterisierung von 33:**



**<sup>1</sup>H-NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = **8.10** [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H})$  = 7.80 Hz;  $^4J(6\text{-H})$  = 1.60 Hz; 8-H],  $\delta$  = **7.97** [d, 1H,  $^3J(2\text{-H})$  = 10.0 Hz, 1-H],  $\delta$  = **7.85** [d, 1H,  $^3J(6\text{-H})$  = 8.00 Hz, 5-H],  $\delta$  = **7.60** [t, 1H,  $^3J(6\text{-H}, 8\text{-H})$  = 8.20 Hz;  $^4J(5\text{-H})$  = 1.50 Hz; 7-H],  $\delta$  = **7.39** [t, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 7\text{-H})$  = 8.4 Hz, 6-H],  $\delta$  = **6.96** [d, 1H,  $^4J(2\text{-H})$  = 2.40 Hz, 4-H],  $\delta$  = **6.54** [dd, 1H,  $^3J(1\text{-H})$  = 9.00 Hz,  $^4J(4\text{-H})$  = 2.40 Hz, 2-H],  $\delta$  = **3.20** [s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

**<sup>13</sup>C-NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)

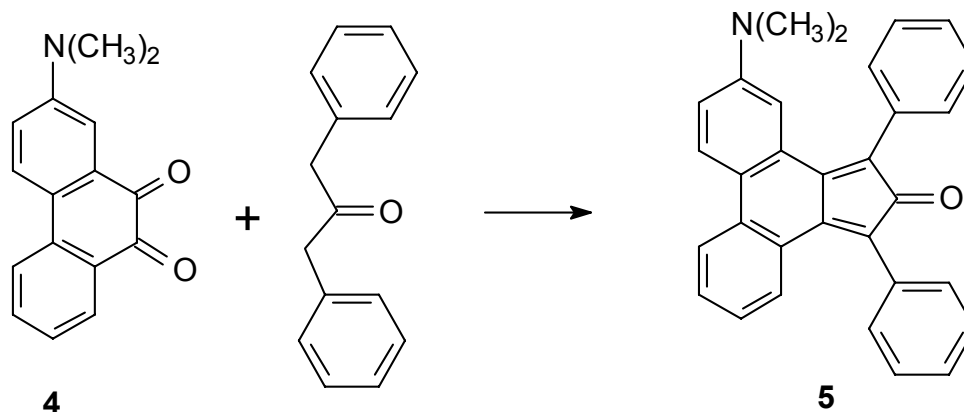
$\delta$  = **181.9, 177.3** (C-9, C-10),  $\delta$  = **155.1** (C-3),  $\delta$  = **137.4, 136.2, 133.8, 131.8** (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a),  $\delta$  = **134.9, 133.5, 129.8, 129.2, 123.3, 112.1, 105.2** (C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8)

**MS:** (70 eV)

$m/z$  (%): 251 (59) [M<sup>+</sup>], 223 (100) [M<sup>+</sup> - 2 CH<sub>2</sub>]



### 7.2.9 Syntheseoptimierung für 2,5-Diphenyl-3,4-(2-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on (5)<sup>[68]</sup>



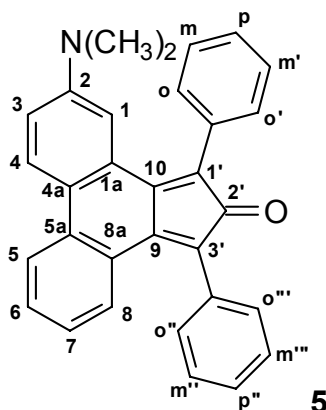
Zunächst wurde 2.00 g KOH in 8.00 g getrocknetem Ethanol (oder frischer p.a.-Ware) in einem verschlossenen Gefäß gelöst. Dies kann am besten im Ultraschallbad geschehen.

Dann wurden 4.60 g (21.9 mmol) 1,3-Diphenyl-2-propanon in einem verschließbaren Gefäß in 10.0 mL trockenem Ethanol gelöst und mit 3.00 mL der ethanolischen KOH-Lösung versetzt. Als nächstes wurden 5.00 g (20 mmol) N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon in einer ausgeheizten Apparatur, bestehend aus einem Dreihalskolben mit Rührstab, Innenthermometer, Argonhahn und Tropftrichter mit Blasenähler, in 40.0 mL Ethanol gelöst und auf 55°C erwärmt (Innentemperatur muss genau einhalten werden!). Dann wurde unter starkem Rühren die 1,3-Diphenyl-2-propanon-Lösung zugetropft. Anschließend wurden die restlichen 3.00 mL der ethanolischen KOH-Lösung ebenfalls zugetropft. Die Temperatur wurde danach noch 5 min auf 55°C gehalten. Das Produkt fiel als schwarzer Feststoff aus. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und zügig über eine D4-Fritte abgesaugt. Der schwarze Rückstand wurde zunächst mit 5.00 mL trockenem Ethanol, dann mit 10.0 mL Diethylether (p.a.) nachgewaschen. Anschließend wurde der Feststoff an der Ölpumpe im Vakuum getrocknet. Die Reinheit des Produktes wurde mittels dünnschichtchromatographischer Analyse (Laufmittel: Toluol:Ethylacetat 3:1 auf Kieselgel 60) überprüft. Es wurde eine grüne Fraktion ( $R_F = 0.61$ ) erhalten.

**Ausbeute:** 6.90 g (16 mmol)  $\equiv$  80 % N,N-Dimethyl-2-aminophencyclon (Lit.<sup>[63]</sup>: 45 %)

Schmp.: 206°C (Lit.<sup>[63]</sup>: 200-205°C)

### Charakterisierung von 5:



### <sup>1</sup>H-NMR:

(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

$\delta = 7.62$  [d, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 7.9$  Hz,  $^4J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.0$  Hz, 5-H],  $\delta = 7.61$  [d, 1H,  $^3J(4\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.9$  Hz, 4-H],  $\delta = 7.46$  [dd, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 8.1$  Hz,  $^3J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.2$  Hz, 8-H],  $\delta = 7.41\text{-}7.35$  [m, 10H, o-, o'-, o''-, o'''-, m-, m'-, m''-, m'''-, p-, p''-H],  $\delta = 7.16$  [dt, 1H,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 7.9$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 8\text{-H}) = 1.2$  Hz, 6-H],  $\delta = 6.84$  [d, 1H,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.8$  Hz, 1-H],  $\delta = 6.77$  [dt, 1H,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 8.1$  Hz,  $^4J(5\text{-H}, 7\text{-H}) = 1.0$  Hz, 7-H],  $\delta = 6.61$  [dd, 1H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 8.8$  Hz,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 2.8$  Hz, 3-H],  $\delta = 2.60$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>]

### <sup>13</sup>C-NMR:

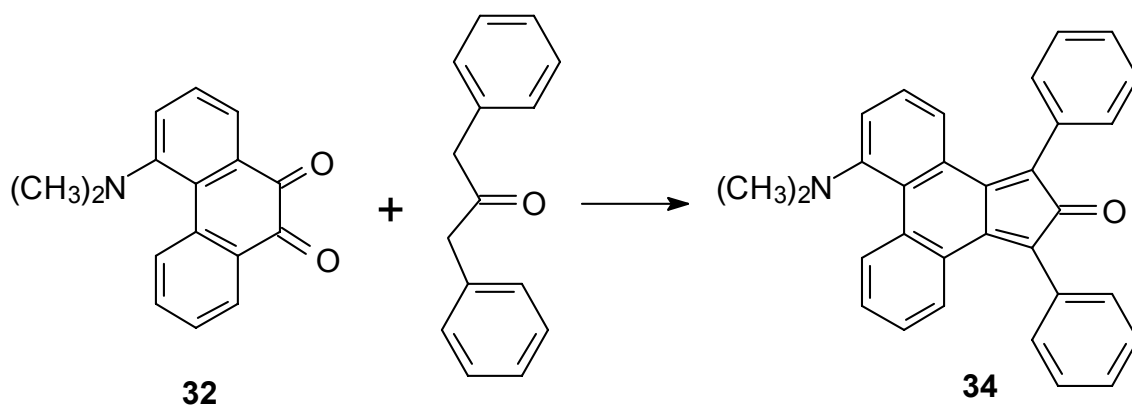
(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

$\delta = 200.6$  (C-2'),  $\delta = 149.7$  (C-2),  $\delta = 149.4, 148.7$  (C-1', C-3'),  $\delta = 134.7, 132.9, 132.6, 128.8, 127.1, 122.9, 122.7, 121.9$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a, C-9, C-10, C-*ipso*-Phenyl),  $\delta = 131.4, 130.2, 130.1, 129.1, 128.6, 128.5, 127.9, 127.8, 126.3, 125.5, 123.2, 115.4, 112.4$  (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, o-, m-, p- Phenyl-C),  $\delta = 39.7$  (CH<sub>3</sub>)

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3059, 3025 \text{ cm}^{-1}$  (=C-H)  $\tilde{\nu} = 2887 \text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 2801 \text{ cm}^{-1}$  (N-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 1696 \text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $\tilde{\nu} = 1598 \text{ cm}^{-1}$  (C=C),  $\tilde{\nu} = 1366 \text{ cm}^{-1}$  (C-N)

### 7.2.10 Synthese von 2,5-Diphenyl-3,4-(4-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on (34)<sup>[68]</sup>



Zur Darstellung von **34** wurde zunächst eine Kaliumhydroxid-Ethanol-Lösung aus 1.00 g Kaliumhydroxid und 4.00 g getrocknetem Ethanol hergestellt. Dann wurden bei ca. 20°C 430 mg (1.71 mmol) N,N-Dimethyl-4-aminophenanthren-9,10-chinon in einen 10 mL-Spitzkolben gegeben und mit 3.34 mL getrocknetem Ethanol versetzt. Separat wurden 360 mg (1.72 mmol) 1,3-Diphenylpropan-2-on ebenfalls in 3.34 mL trockenem Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde mit 109 µL der ethanolischen Kaliumhydroxid-Lösung versetzt. Anschliessend wurde die nun gelbe Lösung schnell bei einer Temperatur von 20°C zur Phenanthrenchinon-Lösung getropft. Dann wurden weitere 109 µL der ethanolischen Kaliumhydroxid-Lösung zugegeben und die Reaktionslösung ca. 15 min sehr kräftig geschüttelt. Dabei fiel ein schwarzer Feststoff aus. Die Reaktionsmischung wurde dann noch 15 min in einem Eisbad gekühlt, um die Bildung des Feststoffes zu vervollständigen. Der Feststoff wurde in der Kälte abfiltriert und mit wenig Ethanol nachgewaschen. Eine dünnschichtchromatographische Analyse zeigte neben einer grünen Zone noch zahlreiche Verunreinigungen durch gelbliche Bestandteile. Eine Reinigung des Feststoffes entfiel, da bei jedem Ansatz nur sehr geringe Mengen anfielen. Zudem reagierte in der nachfolgenden Diels-Alder-Reaktion nur das gebildete Cyclon, wodurch eine

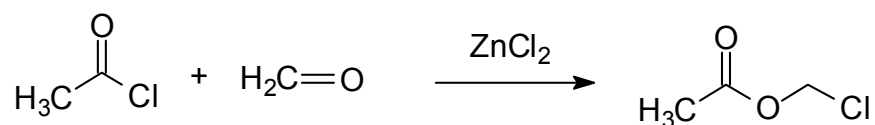
Reinigung in der Folgestufe erzielt werden konnte. Eine Aufarbeitung des Filtrates erbrachte ein nicht trennbares Substanzgemisch. Der Feststoff sollte auch zügig verbraucht werden, da er sich nach wenigen Tagen unter Veränderung der Farbe von dunkelgrün nach gelb zersetzt.

**Ausbeute:** 187 mg (0.44 mmol) = 26 %

#### Charakterisierung von 34:

Eine Charakterisierung des Feststoffes musste entfallen, da bei der Reaktion ein Substanzgemisch entstanden war, welches nicht ohne Zersetzung der Zielsubstanz getrennt werden konnte. Die aufgenommenen NMR-Spektren konnten aufgrund einer Vielzahl von Signalen nicht ausgewertet werden.

#### 7.2.11 Synthese von Chlormethylacetat<sup>[129]</sup>



160 g (143 mL, 2.00 mol) Acetylchlorid und 400 mg (2.90 mol) Zink(II)chlorid wurden unter Schutzgas suspendiert und innerhalb von 30 min portionsweise mit 60.0 g (2.00 mol) Paraformaldehyd (Formaldehydlieferant) versetzt. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch 2 h auf 45°C erwärmt. Dann wurden der Katalysator und nicht umgesetztes Paraformaldehyd durch Filtration über eine Umkehrfritte mit 120 g basischen Aluminiumhydroxid abgetrennt und das Säulenmaterial mit 180 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen. Dann wurden zweimal je 100 mL Dichlormethan zugesetzt und jeweils wieder entfernt, um leichtflüchtige Komponenten abzutrennen. Anschliessend wurde der wasserklare Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktionierend kondensiert. Die Fraktionen wurden mittels GC/MS untersucht, wobei nur die 2. Fraktion mit einem Anteil von 89 % Chlormethylacetat verwendet wurde. Die Fraktionen 1 und 3 wurden

ein weiteres Mal kondensiert. Hier ergab das GC/MS eine Reinheit von 83 % des gewünschten Produktes.

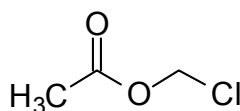
**Ausbeute:** 74.3 g (0.69 mol) = 35 % (Lit.<sup>[63]</sup>: 32 %)

**<sup>1</sup>H-NMR:**

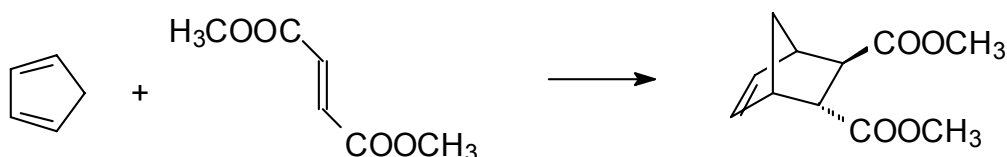
(CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

$\delta = 5.62$  (s, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 2.06$  (3H, CH<sub>3</sub>)

(leichte Verunreinigungen durch Lösungsmittel und Nebenprodukte)



### 7.2.12 Synthese von Norborn-5-en-2,3-(*E*)-dicarbonsäure- dimethylester<sup>[130]</sup>



Für diese Synthese wurde zunächst Cyclopentadien durch Cracken hergestellt. Hierzu wurde das Dicyclopentadien in einer Destillationsapparatur auf 180°C erhitzt und das Monomere Cyclopentadien abdestilliert.

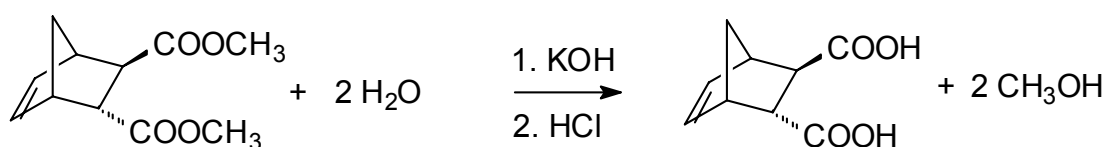
Dann wurde ein Gemisch von 186 g (2.81 mol) des frisch destillierten Cyclopentadiens und 135 g (0.94 mol) Fumarsäuredimethylester in 281 mL Dioxan gelöst und 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Aus der farblosen Lösung wurden das Lösungsmittel Dioxan und überschüssiges Cyclopentadien weitestmöglich abkondensiert. Dabei wurde ein gelber Feststoff erhalten, welcher im Ölpumpenvakuum einer Feststoffdestillation unterzogen wurde (Sdp: 128°C/3.0 Pa (Lit.: 96-98°C/2.0 Pa)). Das erhaltene Produkt enthielt noch Dioxan, wurde jedoch

nicht weiter gereinigt, da dies für die folgende Reaktion zur Norbornendicarbonsäure nicht notwendig war.

**Ausbeute:** 188 g (0.90 mol) = 96 % (Lit.<sup>[130]</sup>: 85 %)

**Schmp.:** 28°C (Lit.<sup>[130]</sup>: 33-35°C)

### 7.2.13 Synthese von Norborn-5en-2,3-(*E*)-dicarbonsäure<sup>[131]</sup>

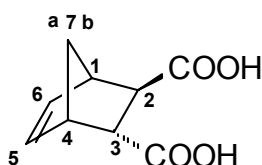


Eine Suspension von 188 g (0.90 mol) Norbornendicarbonsäuredimethylester in 3575 mL Kaliumhydroxid-Lösung (1 M) wurde bei 60°C eine Stunde lang gerührt. Von der gelben Lösung wurden 5 Portionen (je etwa 700 mL) abgenommen, wovon jede dreimal mit je 35 mL Chloroform zur Entfernung nicht umgesetzten Diesters extrahiert wurde. Durch Ansäuern der wässrigen Phase mit 10 %iger Salzsäure bis zu einem pH-Wert von ca. 1 wurde anschliessend die Norbornendicarbonsäure als weisser Feststoff ausgefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert, dreimal mit je 100 mL VE-Wasser gewaschen und getrocknet.

**Ausbeute:** 122 g (0.67 mol) = 76 % (Lit.<sup>[63]</sup>: 88 %)

**Schmp.:** 184°C (Lit.<sup>[63]</sup>: 185-186°C)

**Charakterisierung :**



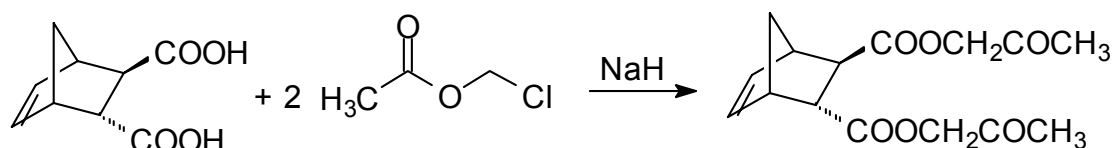
**<sup>1</sup>H-NMR:**(DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta = 12.3$  [br s, 2H, COOH],  $\delta = 6.32$  [dd,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 5.5$  Hz,  $^3J(1\text{-H}, 6\text{-H}) = 3.0$  Hz, 1H, 6-H],  $\delta = 6.07$  [dd,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 5.5$  Hz,  $^3J(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 2.2$  Hz, 1H, 5-H],  $\delta = 3.34$  [d, 1H,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 6.2$  Hz, 1-H],  $\delta = 3.19$  [t,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 6.9$  Hz,  $^3J(\text{H-2}, \text{H-3}) = 3.3$  Hz, 1H, 3-H],  $\delta = 3.05$  [s, 1H, 4-H],  $\delta = 2.34$  [d,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 3.2$ , 1H, 2-H],  $\delta = 1.54$  [d,  $^2J(7\text{a-H}, 7\text{-b-H}) = 8.5$  Hz, 1H, 7b-H],  $\delta = 1.37$  [d,  $^2J(7\text{a-H}, 7\text{b-H}) = 8.5$  Hz, 1H, 7a-H].

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3100$  cm<sup>-1</sup> (O-H),  $\tilde{\nu} = 2997$  cm<sup>-1</sup>- 2881 cm<sup>-1</sup> (C-H),  $\tilde{\nu} = 1696$  cm<sup>-1</sup> (C=O),  $\tilde{\nu} = 1423$  cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>),  $\tilde{\nu} = 1277$  cm<sup>-1</sup> (C-O)

### 7.2.14 Synthese von Norborn-5en-2,3-(*E*)-dicarbonsäurediacetoxymethylester<sup>[63]</sup>

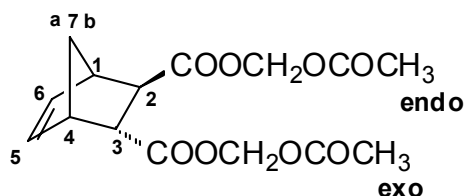


Einer gerührten Lösung von 9.11 g (50 mmol) Norbornendicarbonsäure in 100 mL Dimethylformamid in einer Apparatur, die mit einem KPG-Rührer ausgestattet war, wurden bei 0°C 4.80 g (200 mmol) Natriumhydrid in ca. 10 Portionen zugesetzt. Da die Mischung nach Zugabe von etwa 5 Portionen nicht mehr rührfähig war, wurden weitere 50 mL Dimethylformamid zugegeben. Dann wurden mittels eines gekühlten Tropftrichters (Trockeneis/Isopropanol: -10°C) 10.8 g (100 mmol) Chlormethylacetat innerhalb von 30 min zugetropft. Nach Zugabe von weiteren 50 mL Dimethylformamid wurde die Reaktionsmischung 4 h auf 40°C erwärmt und gerührt. Nach dem Abkühlen der Mischung wurde nicht umgesetztes Natriumhydrid abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde bei 35°C abkondensiert. Dabei fielen 10.6 g Rohprodukt

an. Das gelbliche Rohprodukt wurde bei 130°C in einer Kugelrohrapparatur im Ölpumpenvakuum (10 Pa) fraktionierend destilliert.

**Ausbeute:** 7.67 g (23.5 mmol) = 47 % (Lit.<sup>[63]</sup>: 38 %)

**Charakterisierung:**

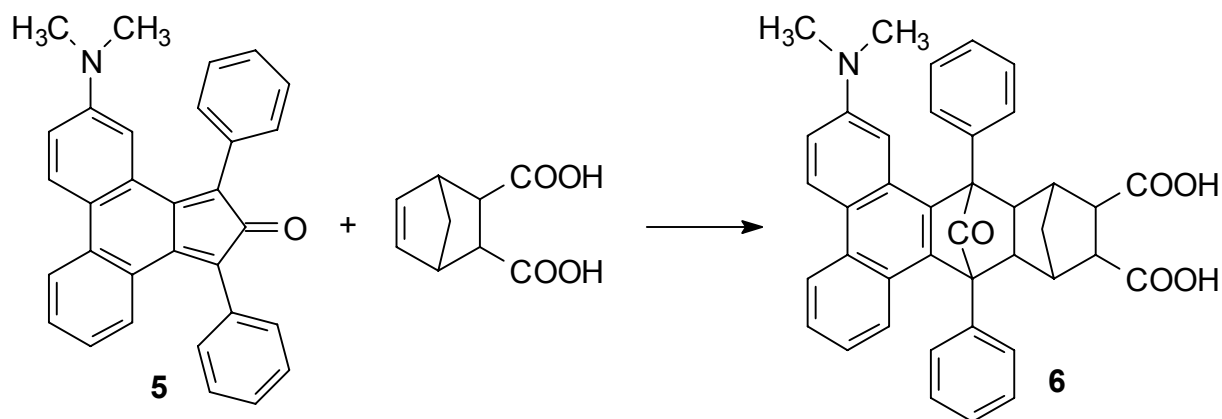


**<sup>1</sup>H-NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

$\delta = 6.31$  [m, 1H, 6-H],  $\delta = 6.05$  [m, 1H, 5-H],  $\delta = 5.85-5.30$  [m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-O, endo und exo],  $\delta = 3.45$  [t, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 4.2 Hz, 1H, 3-H],  $\delta = 3.32$  [br, s, 1H, 4-H],  $\delta = 3.15$  [br, s, 1H, 1-H],  $\delta = 2.74$  [dd, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 4.3 Hz, 1H, 2-H],  $\delta = 2.14-2.05$  [d, 6H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 1.49-1.70$  [m, 2H, 7a-H, 7b-H].

### 7.2.15 Syntheseoptimierung für 3,5-Diphenyl-3,5-(2-dimethylamino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-dicarbonsäure (6)<sup>[63]</sup>



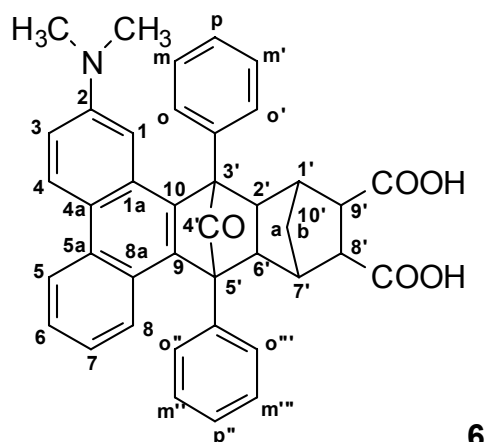


In einer ausgeheizten und mit Argon befüllten Apparatur bestehend aus einem 250 mL-Dreihalskolben mit Rührstab und Rückflußkühler wurden 5.00 g (11.7 mmol) N,N-Dimethyl-2-aminophencyclon und 1.80 g (9.90 mmol) Norbornendicarbonsäure in 100 mL Chlorbenzol gelöst. Dann wurde das Reaktionsgemisch unter Lichtausschluß 8 h unter Rückfluß zum Sieden (130°C) erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde bis zur Trockene einrotiert und anschließend in der für die vollständige Lösung des Feststoffes erforderlichen Menge an Tetrahydrofuran aufgenommen. Dann wurde das Lösungsmittel wieder bis auf ca. 50 mL abgezogen und das Produkt in der 10-fachen Menge n-Heptan ausgefällt. Der beige Feststoff wurde abfiltriert und zusammen mit dem zuvor bereits abfiltrierten Feststoff in eine Soxhlet-Apparatur überführt und mit Toluol extrahiert, bis das übergehende Extrakt hellgelb und klar war. Der gereinigte Feststoff wurde in der Extraktionshülse getrocknet und anschließend in einen 1 L-Erlenmeyerkolben mit Kunststoffstopfen überführt und mit 600 mL Tetrahydrofuran versetzt. Der Feststoff wurde im Dunkeln unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst, was bis zu 3 Tage in Anspruch nahm. Dann wurden der braunen Lösung 2.00 g Aktivkohle zugesetzt und noch ca. 30 min gerührt. Die Lösung wurde über einen Blaubandfilter von der Aktivkohle abfiltriert. Die verbliebene hellgelbe Lösung wurde auf ca. 100 mL einrotiert und in 1000 mL Heptan ausgefällt. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und zunächst auf dem Filter, anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet, um Reste von n-Heptan zu entfernen.

**Ausbeute:** 3.00 g (5.00 mmol)  $\equiv$  50 % (Lit.<sup>[63]</sup>: 72 %)

**Schmp.:** 293°C (Zers.) (Lit.<sup>[63]</sup>: 289-295°C, Zers.)

## Charakterisierung von 6:

**<sup>1</sup>H-NMR:**(THF-d<sub>8</sub>, 500 MHz)

$\delta = 11.0$  [s, br, 2H, COOH],  $\delta = 8.57$  [d, 1H,  $^3J = 8.3$  Hz, 5-H]  $8.54$  [d, 1H,  $^3J = 9.4$  Hz, 4-H],  $\delta = 8.14$  [dd, 1H,  $^4J = 7.8$  Hz,  $o'$ -H oder  $o'''$ -H],  $\delta = 8.08$  [dd, 1H,  $^4J = 7.8$  Hz,  $o'$ -H oder  $o'''$ -H]  $\delta = 7.65$  [t, 1H,  $^3J = 7.9$  Hz,  $m'$ -H oder  $m'''$ -H]  $\delta = 7.56$ - $7.58$  [m, 1H,  $m'$ -H oder  $m'''$ -H],  $\delta = 7.44$ - $7.32$  [m, 5H,  $o$ -H,  $m''$ -H,  $p''$ -H, 6-H, 8-H],  $\delta = 7.22$ - $6.96$  [m, 5H, 3-H, 7-H,  $o''$ -H,  $m$ -H,  $p$ -H],  $\delta = 6.43^*$  [dd, 1H,  $^4J = 2.8$  Hz, 1-H],  $\delta = 3.21$  [s, 2H, 2'-H, 6'-H],  $\delta = 3.18$ - $3.15$  [m, 1H, 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 3.06$  [dd, 1H,  $^3J = 5.3$ ,  $^4J = 1.7$ , 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 2.95$ - $2.82^*$  [m, 2H, 1-H, 7-H],  $\delta = 2.63$ ,  $2.62^*$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 0.55^*$  [t, 1H,  $^2J = 10.4$  Hz, 10'b-H],  $\delta = -0.34^*$  [t, 1H,  $^2J = 9.6$  Hz, 10'a-H]

**<sup>13</sup>C-NMR:**(THF-d<sub>8</sub>, 125 MHz)

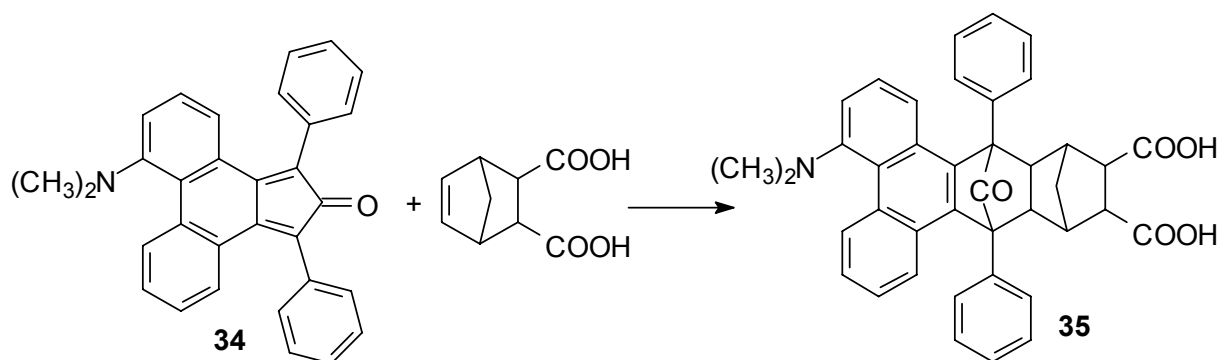
$\delta = 199.2$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\delta = 174.9$ ,  $174.2$  (C=O)<sub>Säure</sub>,  $\delta = 149.5$  (C-2),  $\delta = 139.2^*$ ,  $138.8$ ,  $138.7$ ,  $138.3^*$ ,  $135.7^*$ ,  $135.5$ ,  $134.8$ ,  $134.6^*$ ,  $130.2$ ,  $130.1^*$ ,  $127.1^*$ ,  $127.1$ ,  $122.6$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a, C-9, C-10, C-ipso-Phenyl),  $\delta = 132.9$ ,  $132.6$ ,  $129.8^*$ ,  $129.7$ ,  $129.6$ ,  $129.5^*$ ,  $129.2$ ,  $129.0^*$ ,  $128.9$ ,  $128.8^*$ ,  $128.7$ ,  $128.6^*$ ,  $128.1^*$ ,  $128.0$ ,  $128.0$ ,  $127.9^*$ ,  $126.9$ ,  $126.2$ ,  $125.0$ ,  $124.9$ ,  $124.8^*$ ,  $123.2$ ,  $115.0$ ,  $114.9^*$ ,  $107.2$ ,  $107.1^*$  (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, CH<sub>arom.</sub>)  $\delta = 64.47$ ,  $64.36$ ,  $64.00$ ,  $63.90$  (C-3', C-5'),  $\delta = 51.97$ ,  $51.86$ ,  $51.25$ ,  $48.47$ ,  $48.24^*$ ,  $45.44$ ,  $44.42$ ,  $44.22$ ,  $43.09$  (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8', C-9'),  $\delta = 40.01$  (CH<sub>3</sub>),  $\delta = 34.84$  (C-10')

\*Diastereomerengemisch aus 2 Komponenten (Verhältnis 2:1). Bezeichnung der Unterschusskomponente.

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu}$  = 3500-2700  $\text{cm}^{-1}$  (O-H, H-Brücken),  $\tilde{\nu}$  = 3057, 3029  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu}$  = 2963  $\text{cm}^{-1}$  (-C-H),  $\tilde{\nu}$  = 1785  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\tilde{\nu}$  = 1727  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Säure</sub>,  $\tilde{\nu}$  = 1613  $\text{cm}^{-1}$  (C=C),  $\tilde{\nu}$  = 1383  $\text{cm}^{-1}$  (C-N),  $\tilde{\nu}$  = 1177  $\text{cm}^{-1}$  (C-O)

**7.2.16 Synthese von 3,5-Diphenyl-3,5-(4-dimethylamino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-dicarbonsäure (35)**

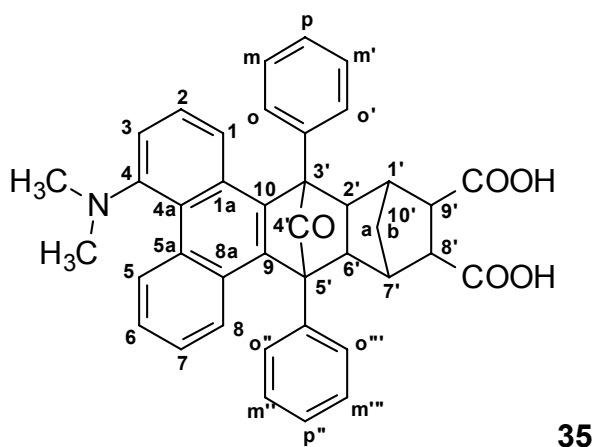


200 mg (0.47 mmol) N,N-Dimethyl-4-aminophenanthrencyclon und 65.0 mg (0.36 mmol) Norbonendicarbonsäure wurden in einer ausgeheizten und mit Schutzgas gefüllten Apparatur in 4.50 mL Chlorbenzol suspendiert und 6 h lang in Dunkelheit bei ca. 130°C unter Rückfluss erhitzt. Dabei verfärbte sich die zuvor grüne Lösung nach gelb-braun und ein hellbrauner Niederschlag fiel aus. Dieser wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeeengt, in 2.00 mL Tetrahydrofuran wieder aufgenommen, in 20 mL n-Heptan ausgefällt und abfiltriert. Zuvor gebildeter Niederschlag und der Filtrerrückstand wurden vereinigt, zu weiteren Reinigung nochmals in Tetrahydrofuran gelöst und in der 10 fachen Menge n-Heptan gefällt, abfiltriert und getrocknet.

**Ausbeute:** 60 mg (0.10 mmol) an **35** = 28 %

**Schmp.:** 254°C (Zers.)

## Charakterisierung von 35:

 $^1\text{H-NMR}$ :(THF- $d_8$ , 500 MHz)

$\delta = 11.2$  [s, br, 2H, COOH],  $\delta = 10.0$  [d, 1H,  $^3J = 8.35$ , 5-H],  $\delta = 8.07$  [t, 1H,  $^3J = 9.1$ , o-H oder , o''-H],  $\delta = 7.92\text{-}7.87$  [dd, 1H,  $^3J = 7.95$ , o-H oder o''-H],  $\delta = 7.66\text{-}7.54$  [m, 2H, [m-H, m''-H],  $\delta = 7.42\text{-}6.98$  [m, 11H, 1-H, 2-H, 6-H, 7-H, 8-H, p-H, o'-H, m'-H, p''-H, o'''-H, m'''-H],  $\delta = 6.82\text{-}6.80$  [m, 1H, 3-H],  $\delta = 3.37\text{-}3.22$  [m, 2H, 2'-H, 6'-H],  $\delta = 3.17\text{-}3.13$  [m, 1H, 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 3.05$  [m, 1H, 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 2.93$  [s, 3H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 2.87\text{-}2.83$  [m, 2H, 1'-H, 7'-H],  $\delta = 2.66$  [s, 3H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 0.49$  [dd, 1H,  $^2J = 11.05$  Hz, 10b-H],  $\delta = -0.40$  [dd, 1H,  $^3J = 11.5$  Hz, 10a-H]

 $^{13}\text{C-NMR}$ :(THF- $d_8$ , 125 MHz)

$\delta = 199.0$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\delta = 174.8, 174.1$  (C=O)<sub>Säure</sub>,  $\delta = 152.7$  (C-4),  $\delta = 138.6, 138.3^*$ ,  $136.3, 136.1^*$ ,  $135.9, 135.7, 132.9, 131.3, 128.7, 124.8, 124.7^*$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a, C-9, C-10, C-*ipso*-Phenyl),  $\delta = 132.5, 132.3^*, 129.7, 129.6, 129.5, 129.4, 129.1^*, 129.0, 128.9^*, 128.8, 128.6, 128.5^*, 128.4, 128.1^*, 128.0, 127.9^*, 127.2, 126.6^*, 126.5, 126.4, 126.3^*, 126.2, 126.1^*, 125.8, 125.8^*, 120.8, 116.4$  (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-8, CH<sub>arom.</sub>),  $\delta = 64.89^*, 64.45, 64.37^*, 63.89$  (C-3', C-5'),  $\delta = 51.17^*, 51.10, 48.05, 48.02^*, 45.47^*, 45.34, 44.09^*, 44.00, 43.09, 42.98, 42.17, 42.16^*$  (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8', C-9'),  $\delta = 51.74, 46.47$  (CH<sub>3</sub>),  $\delta = 34.59, 34.58^*$  (C-10')

\*Diastereomerengemisch, Bezeichnung der Unterschuskomponente

**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3300\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$  (O-H)<sub>Säure</sub>,  $\tilde{\nu} = 3063, 3030\text{ cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu} = 2967, 2910$ , (-C-H),  
 $\tilde{\nu} = 2789\text{ cm}^{-1}$  (N-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 1793\text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\tilde{\nu} = 1718, 1701\text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Säure</sub>

**MS:** (70 eV)

$m/z$  (%) : 607 (71) [M<sup>+</sup>], 579 (100) [M<sup>+</sup>-CO]

Molmassenfeinbestimmung: C<sub>40</sub>H<sub>33</sub>N<sub>1</sub>O<sub>5</sub> [M<sup>+</sup>]

$m/z$  [M<sup>+</sup>]: ber.: 607.235874

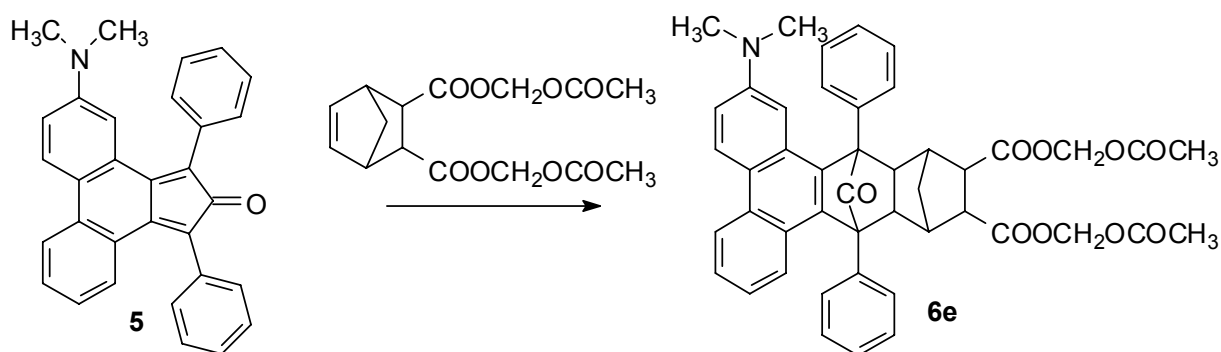
gef.: 607.225239

Abweichung: 17.5 ppm

**EA:**

Keine Auswertung möglich, da im Produkt auch nach Trocknung noch Reste an Tetrahydrofuran, *n*-Heptan und etwas Norbornendicarbonsäure enthalten waren.

**7.2.17 Syntheseoptimierung für 3,5-Diphenyl-3,5-(2-dimethylamino-9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(*E*)-dicarbonsäurediacetoxymethylester (6e)<sup>[63]</sup>**



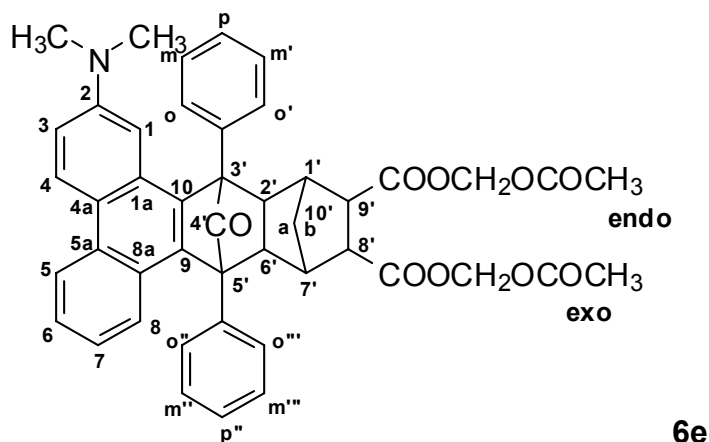
In einer ausgeheizten und mit Argon gefüllten Apparatur bestehend aus einem 100 mL-Dreihalskolben mit Rührstab und Rückflußkühler wurden 1.10 g (2.50 mmol) N,N-Dimethyl-2-aminophenanthren-9,10-chinon und 0.77 g (2.30 mmol) Norbornendicarbonsäurediacetoxymethylester in 20.0 mL Toluol gelöst. Dann wurde das

Reaktionsgemisch unter Lichtausschluß 3.5 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingeeengt und anschließend in der für die vollständige Lösung des Feststoffes erforderlichen Menge an Tetrahydrofuran aufgenommen. Dann wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wieder bis auf 50 mL abgezogen und in der 10-fachen Menge n-Heptan ausgefällt. Der beige Feststoff wurde abfiltriert und anschließend in einen Erlenmeyerkolben mit Kunststoffstopfen überführt und mit 100 mL Tetrahydrofuran versetzt. Der Feststoff wurde im Dunkeln unter Rühren bei Raumtemperatur gelöst, was bis zu 3 Tage in Anspruch nahm. Dann wurden der braunen Lösung 0.50 g Aktivkohle zugesetzt und noch ca. 30 min gerührt. Die Lösung wurde über einen Blaubandfilter von der Aktivkohle abfiltriert. Die verbliebene hellgelbe Lösung wurde auf ca. 20 mL einrotiert und in 200 mL Heptan ausgefällt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abfiltriert und zunächst auf dem Filter, anschließend im Ölpumpenvakuum getrocknet, um Reste von n-Heptan zu entfernen.

**Ausbeute:** 0.90 g (1.40 mmol)  $\equiv$  50 % (Lit.<sup>[63]</sup>: 61 %)

**Schmp.:** 223°C (Zers.) (Lit.<sup>[63]</sup>: 220-230°C, Zers.)

#### Charakterisierung von 6e:



**<sup>1</sup>H-NMR:**(THF-d<sub>8</sub>, 500 MHz)

$\delta = 8.58-8.53$  [m, 2H, 4-H, 5-H],  $\delta = 8.01-7.86$  [m, 2H, o-H, o''-H],  $\delta = 7.70-7.63$  [m, 2H, m-H, m''-H],  $\delta = 7.43-6.97$  [m, 10H, 1-H, 6-H, 7-H, 8-H, o'-H, m'-H, p-H, o'''-H, m'''-H, p''-H],  $\delta = 6.41-6.39$  [m, 1H, 3-H],  $\delta = 5.95-5.91^*$  [m, 1H, OCH<sub>2</sub>O],  $\delta = 5.67-5.61$  [m, 2H, OCH<sub>2</sub>O],  $\delta = 3.27-3.19$  [m, 3H, 1'-H oder 7'-H, 2'-H, 6'-H],  $\delta = 3.15, 3.12^*$  [d, 1H,  $^3J = 4.1$  Hz, 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 3.04, 2.97^*$  [d, 1H,  $^3J = 4.2$  Hz, 8'-H oder 9'-H],  $\delta = 2.86, 2.80^*$  [s, 1H, 1'-H oder 7'-H],  $\delta = 2.63$  [s, 6H, NCH<sub>3</sub>],  $\delta = 2.01, 1.98^*, 1.97^*, 1.95$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 0.55$  [d, 1H,  $^2J = 11.9$  Hz, 10'b-H],  $\delta = -0.31$  [d, 1H,  $^2J = 11.9$  Hz, 10'a-H]

**<sup>13</sup>C-NMR:**(THF-d<sub>8</sub>, 125 MHz)

$\delta = 197.0$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\delta = 171.6, 169.8, 167.9, 167.6$  (C=O)<sub>Ester</sub>,  $\delta = 147.7^*, 147.6$  (C-2),  $\delta = 136.9^*, 136.7, 136.4, 136.2^*, 134.0, 133.8^*, 133.5^*, 133.4, 132.9^*, 132.5, 127.9, 127.9^*, 121.3^*, 121.3$  (C-1a, C-4a, C-5a, C-8a, C-9, C-10, C-*ipso*-Phenyl)  $\delta = 131.0, 130.8^*, 130.6, 128.3^*, 128.2, 128.1, 127.4, 127.3, 127.2^*, 127.2^*, 126.9, 126.8, 126.7, 126.4, 126.2, 126.1, 125.2, 124.3, 123.0, 120.8, 120.8, 113.2, 105.2$  (C-1, C-3, C-4, c-5, C-6, C-7, C-8, alle C-*o*, C-*m*, C-*p*),  $\delta = 78.86, 78.79, 78.73, 78.68$  (OCH<sub>2</sub>O),  $\delta = 62.52, 62.37, 62.15, 62.01$  (C-3', C-5'),  $\delta = 49.78^*, 49.19, 46.31, 43.43, 43.37^*, 42.36^*, 41.37^*, 41.34$  (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8', C-9'),  $\delta = 38.17^*, 38.12$  (NCH<sub>3</sub>),  $\delta = 32.94$  (C-10'),  $\delta = 18.60, 18.38^*$  (CH<sub>3</sub>)

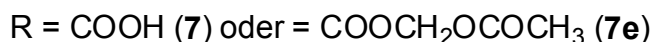
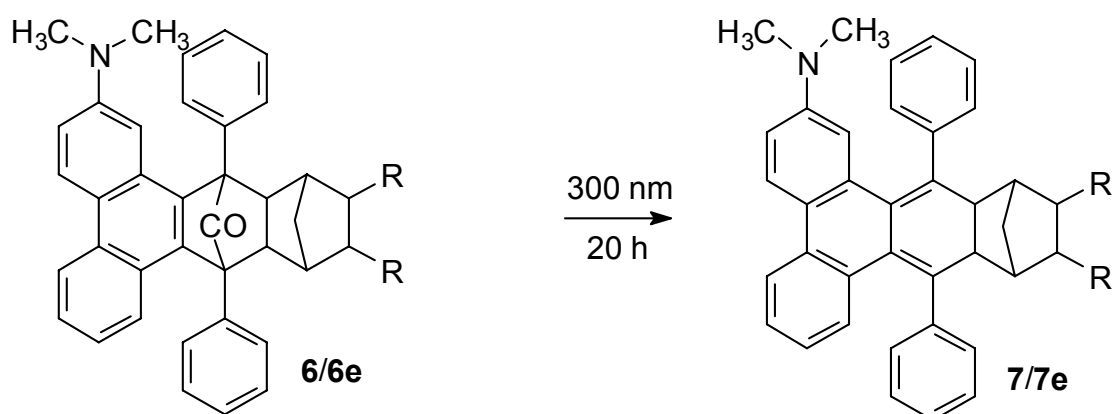
**IR (KBr):**

$\tilde{\nu} = 3029, 3029$  cm<sup>-1</sup> (=C-H),  $\tilde{\nu} = 2976, 2920$  cm<sup>-1</sup> (-C-H),  $\tilde{\nu} = 2801$  cm<sup>-1</sup> (N-CH<sub>3</sub>),  $\tilde{\nu} = 1748$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\tilde{\nu} = 1746$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Ester</sub>,  $\tilde{\nu} = 1614$  cm<sup>-1</sup> (C=C),  $\tilde{\nu} = 1174$  cm<sup>-1</sup> (C-O)

**MS: (70 eV)**

*m/z* (%): 751 (20) [M<sup>+</sup>], 723 (100) [M<sup>+</sup>-CO]

**7.2.18 Syntheseoptimierungen für 3,6-Diphenyl-4,5-(2-dimethylamino-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(*E*)-dicarbonsäure (*FNOCT-Säure*) und – diacetoxymethylester (*FNOCT-Ester*)<sup>[63]</sup> (**7**) und (**7e**)**



Die Darstellung des FNOCT (Säure **7** und Ester **7e**) verläuft über Photolyse in einer speziellen, für diese Arbeit entwickelten Reaktionsapparatur.

50.0 mg des zuvor synthetisierten Diels-Alder-Adduktes wurden in die Photolyseapparatur eingewogen. Diese wurde anschließend in ein spezielles Schlenkgefäß eingebracht und ca. 30 min lang evakuiert. Dann wurde der Schlenk mit Argon belüftet und unter Schutzgas 30 mL frisch getrocknetes und destilliertes Tetrahydrofuran zugesetzt. Mit Hilfe des Einsatzes konnte der Feststoff schnell durch leichtes Umrühren in Lösung gebracht werden. Die Apparatur wurde durch einen Schliffstopfen verschlossen und mit einer Klammer gesichert. Dann wurde die Apparatur aus dem Schlenkgefäß gehoben und in den im Photoreaktor (Rayonette) befindlichen Quarzglaskühlmantel eingehängt. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung bei –30°C für 20 h (Säure) bzw. 18 h (Ester) mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300$  nm bestrahlt, was zur Freisetzung von CO aus der Verbindung führt.

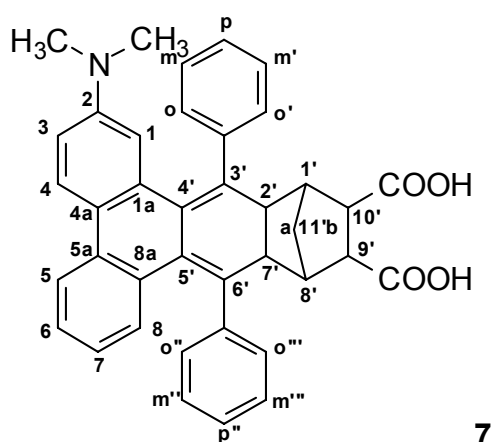
Zur Aufarbeitung wurde der Reaktor geöffnet und der Inhalt komplett in einen 50 mL-Kolben gegossen. Das Lösungsmittel wurde abgezogen, wobei die Temperatur des Wasserbades am Rotationsverdampfer 30°C nicht übersteigen sollte. Auch sollte dieser Schritt schnellstmöglich vonstatten gehen, um die Lösung nicht zu lange zu



erwärmen. Dann wurde der Rückstand in ca. 1.00 mL trockenem THF aufgenommen und in ein kleines Schlenkgefäß überführt, das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abgezogen und der verbleibende Feststoff getrocknet. Dies nahm ca. 2 Tage in Anspruch.

**Ausbeute:** Jeweils quantitativ, Reinheiten<sup>a</sup> ca. 95 %

### Charakterisierung von 7:



### <sup>1</sup>H-NMR:

(THF-d<sub>8</sub>, 500 MHz)

$\delta = 11.0$  [s, br, 2H, COOH],  $\delta = 7.61$  [d, 1H,  $^3J = 9.2$  Hz, 4-H oder 5-H],  $\delta = 7.58$  [d, 1H,  $^3J = 8.7$  Hz, 4-H oder 5-H],  $\delta = 7.50-7.47$  [m, 2H, o-H, o'-H],  $\delta = 7.41$  [d, 1H,  $^3J = 7.1$  Hz, *m*-H oder *m'*-H],  $\delta = 7.36$  [d, 1H,  $^3J = 7.2$  Hz, *m*-H oder *m'*],  $\delta = 7.29-6.94$  [m, 8H, 1-H, 3-H, o''-H, o'''-H, *m''*-H, *m'''*-H, *p*-H, *p''*-H],  $\delta = 6.65-6.50$  [m, 3H, 6-H, 7-H, 8-H], ( $\delta = 3.30-3.13$  [m, 3-H],  $\delta = 3.01-2.96$  [m, 1H],  $\delta = 2.84-2.80$  [m, 1H],  $\delta = 2.70$  [d, 1H,  $J = 2.9$  Hz] 1'-H, 2'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H, 10'-H),  $\delta = 2.50^*$ ,  $2.48$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 2.15$  [dd, 1H,  $^2J = 10.3$  Hz, 11'b-H],  $\delta = 1.61$  [dd, 1H,  $^3J = 10.2$  Hz, 11'a-H]

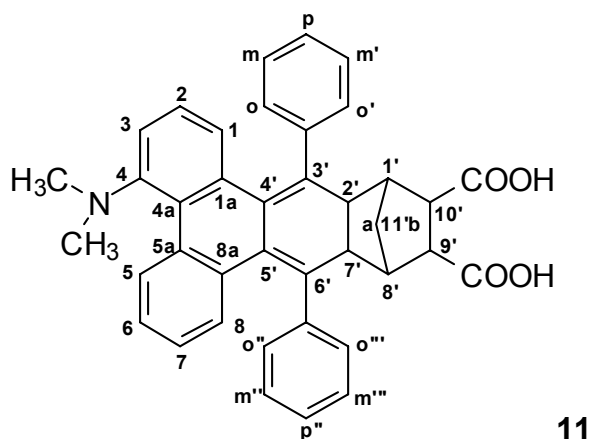
<sup>a</sup> Relative Bestimmung durch Vergleich der Höhe der NMR-Signale der Dimethylamino-Gruppe von Produkt und Edukt bei 2.5 bzw. 2.6 ppm.



Dieser Versuch wurde zunächst in einem Quarz-NMR-Röhrchen durchgeführt. Hierzu wurden 10 mg des Diels-Alder-Adduktes **35** in das Röhrchen eingewogen. Dann wurden 0.70 ml an deuteriertem Tetrahydrofuran zugesetzt. Das Röhrchen wurde durch ein Septum verschlossen und ca. 30 min lang mit Stickstoff gespült. Anschliessend wurde es in eine im Photolyse-Reaktor befindlichen Kühlmantel mit Ethanol als Kühlmittel eingebracht und die Temperatur auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgesenkt. Danach begann die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300\text{ nm}$ . Um den Fortgang der Reaktion beobachten zu können, wurden zwischendurch nach etwa 20, 42, 65, 73 und 81 h  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Probe aufgenommen. Nach 77 h war die Reaktion abgeschlossen, nach 81 h wurde das Auftreten von Nebenprodukten beobachtet. So wurde die Reaktion abgebrochen. Der Inhalt des NMR-Röhrchens wurde in ein Schlenkgefäss überführt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum abgezogen. Anschliessend wurde der verbliebene Feststoff noch 2 Tage im Ölpumpenvakuum getrocknet.

**Ausbeute:** quantitativ, Reinheit<sup>b</sup>: 77 %

### Charakterisierung von **11**:



<sup>b</sup> Relative Bestimmung durch Vergleich der Höhe der NMR-Signale des Protons 5 von Produkt und Edukt bei 8.65 bzw. 10.0 ppm.

**<sup>1</sup>H-NMR:**

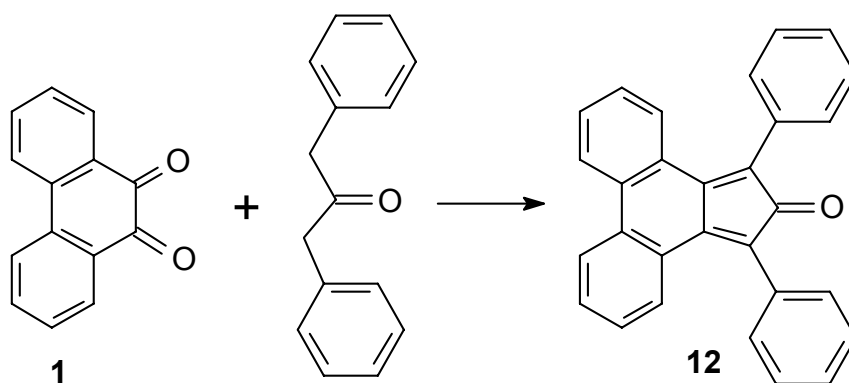
(THF-d<sub>8</sub>, 200 MHz)

$\delta = 11.0$  [s, br, 2H, COOH],  $\delta = 8.65$  [d, 1H, 5-H],  $\delta = 7.74-6.53$  [m, 16H, 1-H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H, 8-H, o-H, *m*-H, *p*-H], ( $\delta = 3.33-3.31$  [m, 4H],  $\delta = 3.20$  [s, 1H],  $\delta = 3.08$  [s, 1H], 1'-H, 2'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H, 10'-H)  $\delta = 2.67$  [s, 6H, CH<sub>3</sub>],  $\delta = 1.99$  [d, 1H, 11'b-H],  $\delta = 1.60$  [m, 1H, 11'a-H]

Weitere Analysen des Produktes mussten entfallen, da nur ein Umsatz von ca. 77 % erreicht wurde. Daher liegen mögliche Verunreinigungen durch Edukt und Zersetzungsprodukte vor.

### 7.3 Syntheseversuche für einen Triphenylen-haltigen o-chinoiden Fluoreszenzmarker

#### 7.3.1 Synthese von 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on (Phenanthrencyclon) (12)<sup>[71]</sup>

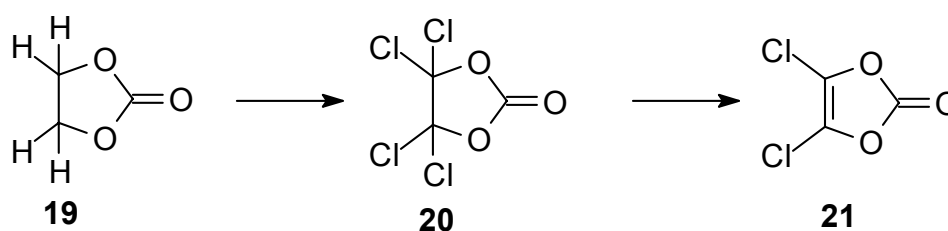


Aus 8.00 g (34 mmol) 9,10-Phenanthrenchinon und 8.00 g (38 mmol) 1,3-Diphenylpropan-2-on wurde eine Suspension in 200 ml Ethanol hergestellt. Anschliessend wurden bei Raumtemperatur soviel von insgesamt 24.0 mL einer ethanolischen Kaliumhydroxid-Lösung (Konzentration: 4.80 g Kaliumhydroxid auf 24.0 mL Ethanol) zugetropft, bis sich das Edukt, 9,10-Phenanthrenchinon gelöst hatte. Das Gemisch verfärbte sich dabei grün. Dann wurde auf 45°C erwärmt und die restliche Kaliumhydroxid-Lösung zugetropft. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch ca. 30 min auf 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch eine Nacht im Gefrierschrank bei -18°C gehalten. Der dann ausgefallene Feststoff wurde über eine Nutsche abgesaugt und getrocknet.

**Ausbeute:** 9.00 g (24 mmol)  $\equiv$  71 % Phenanthrencyclon (Lit.<sup>[71]</sup>: 90 %)

**Schmp.:** 269°C (Lit.<sup>[71]</sup>: 273°C)

### 7.3.2 Synthese von Dichlorvinylencarbonat (DCVC) (21)<sup>[73]</sup>



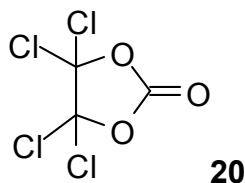
#### 7.3.2.1 Chlorierung von Ethylencarbonat (19)<sup>[73]</sup>

Die Chlorierung wurde in einem speziellen Photoreaktor <sup>c</sup>durch Einleiten von Chlorgas durchgeführt.

In den Reaktor wurden 88.0 g (1.00 mol) Ethylencarbonat und 200 mL Tetrachlormethan eingefüllt und auf ca. 70°C erwärmt. Nachdem sich der Feststoff aufgelöst hatte, wurde die UV-Lampe (Breitbandspektrum) eingeschaltet. Dann wurde ein kräftiger Chlorgasstrom eingestellt und durch die Reaktionslösung geleitet. Die Reaktion konnte gut durch die Stärke des Chlorgasstroms unter Kontrolle gehalten werden. Nach ca. 6 h wurde das zuvor farblose Reaktionsgemisch gelblich und im Rückflusskühler wurde grünliches Chlorgas beobachtet. Daraufhin wurde die Reaktion durch Unterbrechung des Chlorgasstroms beendet. Die Lampe wurde 30 min später abgeschaltet. Zur Kontrolle des Umsatzes wurde eine Probe der Reaktionslösung abgenommen, vom Lösungsmittel Tetrachlormethan abgetrennt und in deuteriertem Chloroform ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum aufgenommen. Da nur das Signal des Lösungsmittels gefunden wurde, konnte von einer erschöpfenden Chlorierung ausgegangen werden. Um Reste des Chlorgases zu entfernen wurde dann Stickstoff durch die Apparatur geleitet. Dann wurde der Inhalt des Reaktors in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel abdestilliert. Anschliessend erfolgte noch eine fraktionierende Destillation (52°C / 1.0 kPa) des Produktes. Es wurden drei Fraktionen aufgefangen, die nach Überprüfung der Reinheit vereinigt wurden.

**Ausbeute:** 200 g (0.90 mol) = 89 % (Lit.<sup>[73]</sup>: 82 %)

<sup>c</sup> Die Apparatur ist in der Literatur<sup>[73]</sup> exakt beschrieben.

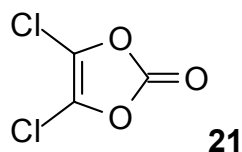
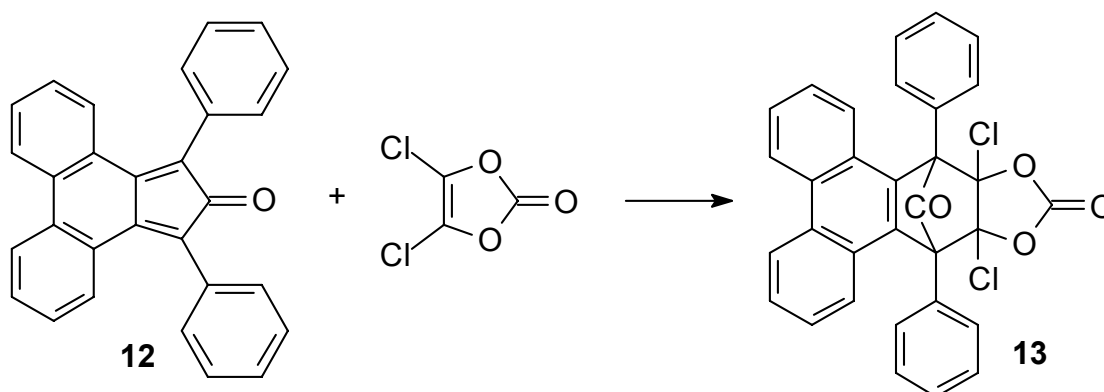
**Charakterisierung von 20:** **$^{13}\text{C}$ -NMR:**(CDCl<sub>3</sub>, 50 Mhz) $\delta = 142.9$  (CO),  $\delta = 113.5$  (CCl<sub>2</sub>)**7.3.2.2 Darstellung von aktiviertem Zinkstaub nach LeGoff<sup>[73]</sup>**

10.0 g Kupfer(II)acetat wurden in 250 mL Eisessig gelöst und unter Rühren auf 60°C erwärmt. Dann wurden in einer Portion 170 g Zinkstaub zugegeben. Nach einer Minute wurde die Mischung im Eisbad abgekühlt und anschliessend filtriert. Der Zinkstaub wurde in eine Soxhlet-Apparatur überführt und die restliche Essigsäure mit Diethylether herausextrahiert. Der noch feuchte Zinkstaub wurde unter Argongas bis zu seiner Verwendung aufbewahrt.

**7.3.2.3 Umsetzung von Tetrachlorethylencarbonat (20) zu Dichlorvinylencarbonat (DCVC) (21)<sup>[73]</sup>**

Zur Darstellung von Dichlorvinylencarbonat wurden 66.0 g (0.30 mol) Tetrachlorethylencarbonat, 150 mL Diethylether und 1 mL Dinethylformamid unter Rühren auf 55°C erwärmt. Dann wurde in kleinen Portionen der aktivierte Zinkstaub zugesetzt, worauf die Reaktion unter heftigem Rückflusskochen einsetzte. Nachdem die spontane Reaktion abgeklungen war, wurde das Reaktionsgemisch noch ca. 9 h unter Rückfluss gekocht. Anschliessend wurde die durch ausgefallenes Zinkchlorid sehr kolloidale Mischung abgekühlt und vom Zinkstaub abfiltriert. Dann wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Eine Feindestillation (39-40°C / 1.3 kPa) lieferte das gewünschte Produkt, wobei jedoch grosse Mengen eines nicht identifizierten Feststoffes (möglicherweise ein Polymer) im Sumpf verblieben.

**Ausbeute:** 11 g (0.06 mol) = 20 % (Lit.<sup>[73]</sup>: 85 %)

**Charakterisierung von 21:****<sup>13</sup>C-NMR:**(CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) $\delta = 146.8$  (CO),  $\delta = 125.6$  (ClC=C)**7.3.3 Synthese von 1,4-Diphenyl-5,6-phenanthrylen-(bicyclo[2.2.1]heptan-7-on)-2,3-dichlor-2,3-diolcarbonat (13)<sup>[72]</sup>**

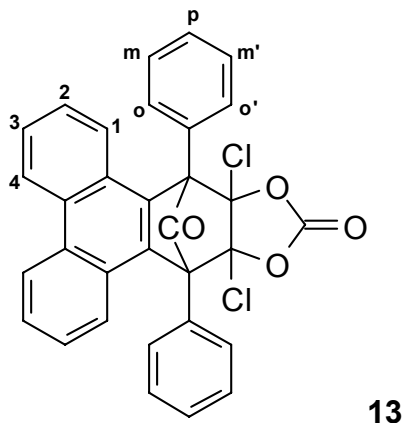
In eine Lösung aus 15 mL trockenem und sauerstofffreiem Toluol und 4.70 g (31.0 mmol) Dichlorvinylencarbonat wurden unter Schutzgas 0.81 g (2.20 mmol) Phenanthrencyclon eingetragen. Dann wurde das Gemisch 42 h unter Rückfluss gekocht. Bei der Zugabe des Phenanthrencyclons verfärbte sich die Lösung zunächst schwarz, wurde aber im Verlauf der Reaktion dunkelgrün und zuletzt hellbraun. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum bei 100°C verblieb ein grünlich-gelber Feststoff, der durch Waschen mit Ethanol und anschliessend mit Ethylacetat gereinigt wurde.

**Ausbeute:** 0.60 g (1.20 mmol) = 57 % (Lit.<sup>[72]</sup>: 74 %)



**Schmp.:** 250°C (Lit.<sup>[72]</sup>: 220°C). Die Abweichung des Schmelzpunktes ist vermutlich auf die höhere Reinheit des synthetisierten Produktes im Gegensatz zur Literatur zu erklären. Hier wurde das Reaktionsprodukt ohne weitere Reinigung umgesetzt.

### Charakterisierung von 13:



### <sup>1</sup>H-NMR:

(CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

$\delta = 8.90-8.53$  [m, 2H, 4-H, 5-H],  $\delta = 8.52-8.30$  [m, 2H, 1-H, 8-H],  $\delta = 7.95-6.67$  [m, 14H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H, o-H, m-H, p-H]

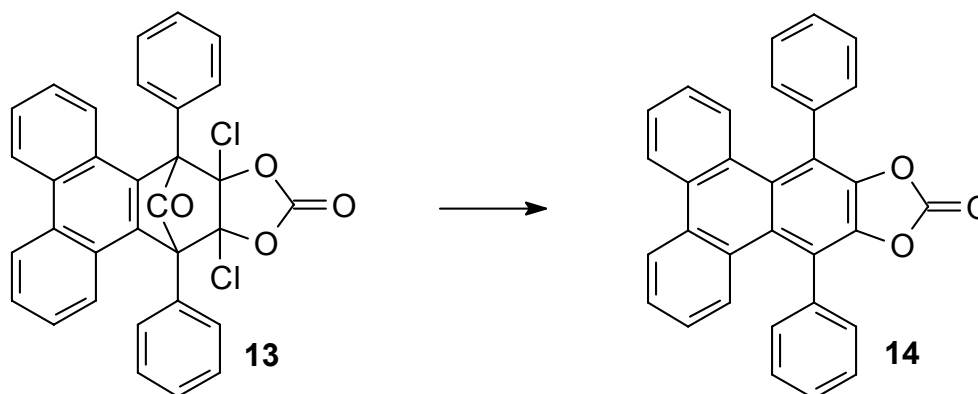
### IR (KBr):

$\tilde{\nu} = 3059 \text{ cm}^{-1}$  (=C-H),  $\tilde{\nu} = 1842 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Carbonat</sub>,  $\tilde{\nu} = 1796 \text{ cm}^{-1}$  (C=O)<sub>Keton</sub>,  $\tilde{\nu} = 1095 \text{ cm}^{-1}$  (C-O)

### MS: (70 eV)

*m/z* (%): 536 (32) [M<sup>+</sup>], 508 (14) [M<sup>+</sup>-CO], 464 (33) [M<sup>+</sup>-CO,-COO], 429 (71) [M<sup>+</sup>-CO, -COO, -Cl], 394 (53) [M<sup>+</sup>-CO, -COO, -Cl<sub>2</sub>], 365 (100) [M<sup>+</sup>-CO, -COO, -Cl<sub>2</sub>, -HCO]

### 7.3.4 Syntheseversuch für 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-diolcarbonat (14)<sup>[72]</sup>



Für die Eliminierung von Chlor aus **23** wurden 0.20 g (0.40 mmol) des Diels-Alder-Adduktes **23**, 0.28 g Zinkstaub, 4.00 mL Eisessig und 20 mL Diethylether 2 h in einem Kolben bei 23°C gerührt. Anschliessend wurde das Gemisch in Chloroform eingegossen und erwärmt, bis sich die organischen Anteile gelöst hatten. Dann wurde von den Trübstoffen (vermutlich Zinkchlorid) abfiltriert und das Lösungsmittel vom Filtrat am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde ein hellgelber Feststoff erhalten, der in einem Methylenchlorid-/Methanolgemisch (1:1) aufgenommen und anschliessend umkristallisiert wurde. Eine Reinigung konnte nicht erzielt werden, da dem gewünschten Produkt noch grössere Mengen an Edukt beigemischt waren, die nicht abgetrennt werden konnten.

**Ausbeute:** 0.10 g (0.3 mmol) = 67 % (Lit.<sup>[72]</sup>: 65 %)

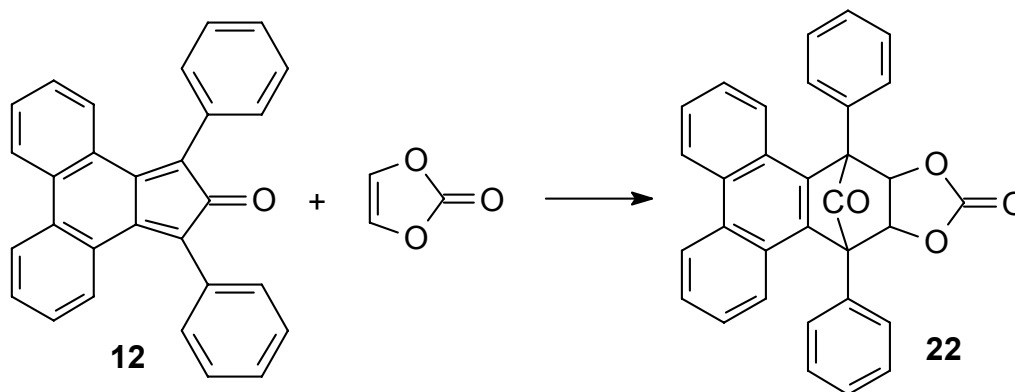
**Schmp.:** 275°C (Lit.<sup>[72]</sup>: >320°C)

**Charakterisierung von 14:**

**<sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR:** nicht auswertbar (Substanzgemisch aus Produkt und Edukt)

**MS:** Zwei Molekülpeaks:  $m/z = 438$  (Produkt **14**) und  $m/z = 536$  (Edukt **13**)

### 7.3.5 Synthese von 1,4-Diphenyl-5,6-phenanthrylen-(bicyclo[2.2.1]heptan-7-on)-2,3-diolcarbonat (**22**)<sup>[74]</sup>

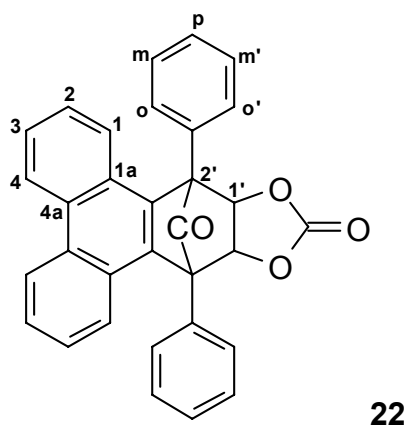


In einem 100 mL-Kolben mit Rückflusskühler wurden 2.00 g (5.20 mmol) Phenanthrencyclon und 0.8 g (5.2 mmol) Vinylencarbonat in 30 mL Toluol gelöst. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wurde anschliessend 2 h lang unter Rückfluss erhitzt, wobei sie sich etwas entfärbte. Beim Abkühlen fiel ein weisser Feststoff aus der Lösung aus, der abgetrennt und getrocknet wurde.

**Ausbeute:** 1.80 g (3.90 mmol) = 74 %

**Schmp.:** 265°C

**Charakterisierung von 22:**



**<sup>1</sup>H-NMR:**(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

$\delta = 8.80$  [d, 2H,  $^3J(o\text{-H}, m\text{-H}) = 8.3$  Hz, *o*-H],  $\delta = 7.93$  [d, 2H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 7.8$  Hz, 4-H],  $\delta = 7.68$  [t, 2H,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 6.6$  Hz, 2-H],  $\delta = 7.55\text{-}7.44$  [m, 4H, *p*-H, *m*-H],  $\delta = 7.42$  [t, 2H,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 7.7$  Hz, 3-H],  $\delta = 7.30$  [d, 2H,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 6.6$  Hz, 1-H],  $\delta = 7.28\text{-}7.20$  [m, 2H, *m'*-H],  $\delta = 7.06$  [d, 2H,  $^3J(o'\text{-H}, m'\text{-H}) = 8.3$  Hz, *o'*-H],  $\delta = 6.27$  [s, 2H, 2'-H]

**<sup>13</sup>C-NMR:**(DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)

$\delta = 194.6$  (CO)<sub>Keton</sub>,  $\delta = 154.0$  (CO)<sub>Carbonat</sub>,  $\delta = 134.8, 134.0, 132.4, 129.6$  (C-2', C-1a, C-4a, C-ipso-Phenyl),  $\delta = 132.1, 130.0, 129.6, 129.1, 128.8, 127.7, 127.1, 126.1, 124.3$  (C-1, C-2, C-3, C-4, CH<sub>arom.</sub>),  $\delta = 78.34$  (C-1')

**IR (KBr):**

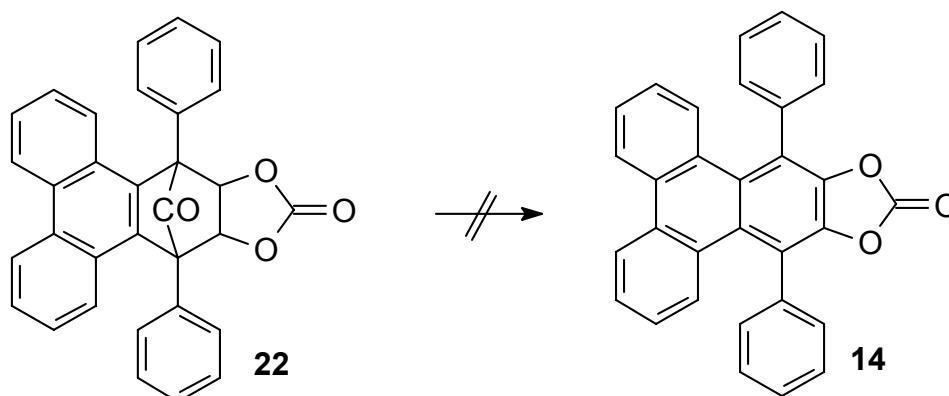
$\tilde{\nu} = 3088\text{-}3004$  cm<sup>-1</sup> (=C-H),  $\tilde{\nu} = 1816$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Carbonat</sub>,  $1796$  cm<sup>-1</sup> (C=O)<sub>Keton</sub>

**EA:** M = 468 g/mol

Ber.: **C** 82.04, **H** 4.30

Gef.: **C** 82.70, **H** 4.23

### 7.3.6 Syntheseveruche für 1,4-Diphenyltriphenylen-2,3-diolcarbonat (**14**)



Das Diels-Alder-Addukt **22** sollte in diesem Reaktionsschritt gleichzeitig decarbonyliert und dehydriert werden, um das Diolcarbonat **14** zu erhalten. Hierzu können sich sowohl thermische als auch photochemische Methoden eignen.

#### 7.3.6.1 Versuche zur thermischen Decarbonylierung und Dehydrierung

Die thermische Decarbonylierung wird bei Temperaturen  $>150^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, genau wie eine Dehydrierung. Letztere wird durch Zusatz eines Katalysators (Palladium/Aktivkohle) erreicht.

Zunächst wurden 0.12 g **22** in je 10.0 mL von verschiedenen hochsiedenden Lösungsmitteln gelöst, mit 0.11 g Palladium/Aktivkohle versetzt und zum Rückfluss erhitzt. Dabei konnte bei Verwendung von Xylol (Sdp.:  $140^{\circ}\text{C}$ ) kein Umsatz beobachtet werden. Aus Mesitylen (Sdp.:  $165^{\circ}\text{C}$ ) und Decalin (Sdp.:  $190^{\circ}\text{C}$ ) konnten nur untrennbare Produktgemische erhalten werden.

#### 7.3.6.2 Versuch der photochemischen Decarbonylierung

Bei der photochemischen Decarbonylierung kann durch Bestrahlung mit UV-Licht (300 nm) eine Abspaltung der Brücken-Carbonylgruppe erreicht werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden kann, was vielleicht eine Zersetzung der eingesetzten und gebildeten Verbindungen, wie sie bei der thermischen Methode auftreten, verhindert.

Ein Vorversuch wurde zunächst in einem Quarz-NMR-Röhrchen durchgeführt, um die Umsetzung verfolgen zu können.

Hierzu wurden 11.0 mg des Diels-Alder-Adduktes **22** in 0.70 mL deuteriertem Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung wurde ca. 30 min lang mit Stickstoff gespült, dann wurde das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Ausgangssubstanz aufgenommen. Das NMR-Röhrchen wurde in den Photoreaktor eingebracht und bei 20°C mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300$  nm bestrahlt. Nach 1, 2, 18 und 22 h wurden weitere NMR-Spektren aufgenommen. Nach 22 h wurde die Reaktion abgebrochen, da keine weiteren Veränderungen des Spektrums beobachtet werden konnten. Die NMR-Spektren waren nicht auswertbar, zeigten aber deutliche Unterschiede zum Eduktspektrum. Das Lösungsmittel wurde dann im Ölpumpenvakuum abkondensiert. Zur weiteren Aufklärung der entstandenen Strukturen wurde zunächst ein IR-Spektrum aufgenommen, welches die Eliminierung der C=O-Bande zeigte, jedoch auch die Neubildung einer OH-Bande bei 3500  $\text{cm}^{-1}$ . Darüber hinaus wurden sowohl aromatische wie auch aliphatische C-H-Schwingungen gefunden. Mittels Dünnschichtchromatographischer Analyse (Kieselgel 60, Toluol:Ethylacetat = 3:1) wurden zwei Verbindungen gefunden. Im Massenspektrum wurde jedoch nur ein Molekülpeak bei  $M/z = 396$  gefunden. Die Daten konnten einem Monoalkohol zugeordnet werden, der als Nebenprodukt bei der photochemischen Synthese eines Oxepins entsteht.

Der Photolyseversuch wurde unter gleichen Bedingungen unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 350$  nm wiederholt. Unter diesen Bedingungen wurde kein Umsatz des Eduktes beobachtet.

## 7.4 Experimente zu Eigenschaften und Anwendungen

### 7.4.1 Verwendete Biochemikalien und Chemikalien

Substanz	Hersteller
Spermin-NONOat	Situs
PAPA-NONOat	Situs
MAHMA-NONOat	Situs
Pluronic F127	Molecular Probes Inc.
Ascorbinsäure	J.T. Baker
Glutathion	Sigma
Bovine SOD	Boehringer Mannheim
Tetrahydrobiopterin	Alexis
Angelis Salz	Cayman Chemical Company
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydrogenphosphat	Fluka
Phosphorsäure 85 %	Acros

#### 7.4.1.1 Ansatz des Phosphatpuffers<sup>[85]</sup>:

Zunächst wurden Stammlösungen von Kaliumdihydrogenphosphat und Natriumhydrogenphosphat (Gehalt je 0.066 mol/L) in entmineralisiertem Wasser angesetzt. Davon wurden Aliquote für je ein Liter Puffer abgenommen:

818 mL Natriumhydrogenphosphat-Lösung und

182 mL Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung

und in einem 1 L-Messkolben gemischt. Anschliessend wurde der genaue pH-Wert des Puffers bei 25°C von 7.24 mittels Phosphorsäure eingestellt.

### 7.4.2 Ansatz von Stamm- und Messlösungen für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen:

Für die Fluoreszenzmessungen wurden von allen verwendeten Substanzen Stammlösungen angesetzt. Die berechneten Sollwerte, die Molarität und das Lösungsmittel der Stammlösungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Substanz	Einwaage [mg] / 1000 mL Lösungsmittel	Molarität (Stammlösung)	Lösungsmittel
FNOCT 7	2.90	5.00 mM	DMSO
FNOCT 7e	3.62	5.00 mM	DMSO
Keton 6	3.04	5.00 mM	Tetrahydrofuran
FNOCT 13	2.90	5.00 mM	DMSO
Keton 12	3.04	5.00 mM	Tetrahydrofuran
Ascorbinsäure	1.98	10.0 mM	Phosphatpuffer
Glutathion	1.54	5.00 mM	Phosphatpuffer
MAHMA/NO	1.02	5.00 mM	NaOH (10 mM)
PAPA/NO	0.88	5.00 mM	NaOH (10 mM)
Spermin/NO	0.79	5.00 mM	NaOH (10 mM)
SOD	1.00	---	Phosphatpuffer
Tetrahydrobiopterin	3.14	100 mM	Puffer (O <sub>2</sub> –frei)
Pluronic	200	---	900 mL DMSO
Angelis Salz	2.44	2.00 µM	NaOH (10 mM)

Zum Ansatz der Messlösungen wurden der jeweiligen Stammlösung Aliquote entnommen und in einer Küvette gemischt. Dann wurden 1000 µL Puffer bzw. Tetrahydrofuran zugegeben. Die Küvettenkonzentrationen sind bei der Beschreibung des jeweiligen Versuches in der Bildunterschrift unter den Diagrammen im allgemeinen Teil angegeben.



Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei 25°C.

Fluoreszenzspektroskopische Daten:

Anregungswellenlänge:  $\lambda = 320 \text{ nm}$

Emissionswellenlänge:  $\lambda = 458 \text{ nm}$

### 7.4.3 Messungen mit der NO-Elektrode

Für die Messungen mit der NO-Elektrode wurden 10 mL Lösung benötigt. Alle Konzentrationen wurden hierfür berechnet.

Substanz	Molarität (Stammlösung)	Molarität (Messlösung)	Lösungsmittel
Ascorbinsäure	10.0 mM	1-5 $\mu\text{M}^*$	Phosphatpuffer
Spermin/NO	5.00 mM	10-30 $\mu\text{M}^*$	NaOH (10 mM)

\*siehe jeweilige Angabe beim Versuch!

Kalibrierung:<sup>[132]</sup>

Natriumnitrit-Lösung: 0.1 M

Kaliumjodid-Lösung: 0.1 M

Schwefelsäure-Lösung: 0.1 M

Zu 10 mL der zuvor gemischten Kaliumjodid-Schwefelsäure-Lösung wurden nacheinander 5.00 (250 nM), 10.0 (500 nM), 15.0 (750 nM) und 20.0  $\mu\text{L}$  (1000 nM) der Natriumnitrit-Lösung gegeben. Dies entspricht einer Gesamtkonzentration von 2500 nM NO, die aus Natriumnitrit in der Lösung freigesetzt werden.

Der Papiervorschub am x,y-Schreiber betrug 0.1 mm/s.

Alle Messungen wurden bei 25°C in Phosphatpuffer (pH = 7.24) durchgeführt.

### 7.4.4 Vitalitätstest<sup>[133]</sup>

#### 7.4.4.1 Verwendete Zellen und Zelllinien:

Zur Durchführung der Vitalitätstests wurden zunächst die verschiedenen Zellarten in Zellkulturgefäßen angezüchtet. In dieser Form wurden sie von Mitarbeiterinnen der

Arbeitsgruppe de Groot zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden zum einen Hepatocyten von männlichen Wistar-Ratten<sup>d</sup>, die frisch kultiviert wurden. Zum anderen wurden als Zelllinien TIBS-Makrophagen, L929-Fibroblasten und 3T3-Zellen für die Untersuchungen eingesetzt.

#### 7.4.4.2 Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien:

**HBSS<sup>e</sup>:** 137.0 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25.0 mM HEPES, pH = 7.4

**KH<sup>f</sup>:** 144.0 mM Na<sup>+</sup>, 6.0 mM K<sup>+</sup>, 1.2 mM Mg<sup>2+</sup>, 2.5 mM Ca<sup>2+</sup>, 128.0 mM Cl<sup>-</sup>, 25.0 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1.2 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 1.2 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 20.0 mM HEPES, pH = 7.4

#### 7.4.4.3 Sonstige Zusätze:

**Glucose:** 10 mM, Einwaage: 0.09 mg Glucose/50 mL KH-Puffer

**Pluronic:** 0.20 g/900 µL DMSO

**FNOCT:** 5 mM, Einwaage: 2.90 mg/1000 µL DMSO

**FNOCT/AM:** 5 mM, Einwaage: 3.04 mg/1000 µL DMSO

Das Volumen der Zellkulturflaschen beträgt 2.5 mL. Um ein Inkubationsmedium mit 50 µM FNOCT bzw. FNOCT/AM herzustellen, wurden 25 µL der Stammlösung entnommen, für eine Konzentration von 25 µM wurden 12.5 µL entnommen und zu den Zellen gegeben.

#### 7.4.4.4 Durchführung:

Zunächst wurden die angezüchteten Zellen mikroskopisch beurteilt, wobei vor allem auf Dichte, gleichmäßige Verteilung und Anheftung der Zellen geachtet wurde. Nach Beschriftung der Kulturgefäße wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen drei mal mit HBSS gewaschen. Anschliessend wurden auf jedes Zellkulturgefäß

---

<sup>d</sup> Die Tiere stammten aus dem Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen und wurden unter Standardbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

<sup>e</sup> HBSS = Hank's balanced salt solution (gepufferte Salzlösung), Waschlösung

<sup>f</sup> KH = Krebs-Henseleit-Puffer, Inkubationsmedium

2.5 mL KH-Puffer und die Zusätze (Glucose und FNOCT bzw. FNOCT/AM) gegeben. Dann wurden die Zellen 6 h inkubiert. Nach jeder Stunde wurden Proben abgenommen und die LDH-Aktivität mit einem Analysenautomat bestimmt. Am Ende des Versuches wurden die Zellen durch Zugabe von 25 %igem Triton X100 lysiert, um die Gesamt-LDH zu bestimmen. Daraus konnte dann die prozentuale LDH-Freisetzung berechnet werden.

## 8 Literaturverzeichnis

### 8.1 Übersichtsartikel

- [1] R. F. Furchgott, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1990-2000.
- [2] F. Murad, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1976-1989.
- [3] L. J. Ignarro, *Angew. Chem* **1999**, *111*, 2002-2013.
- [4] S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109-142.
- [5] S. H. Snyder, D. S. Bredt, *Spektrum der Wissenschaft*, **1992**, 72-80.
- [6] P. L. Feldmann, O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Chem. Eng. News* **1993**, *71*, 26-38.
- [7] H.-J. Galla, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 399-402.
- [8] A. R. Butler, D. L. H. Williams, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 233-241.
- [9] U. Förstermann, *Biochemie* **1994**, *24*, 62-69.
- [10] M. Fontecave, J.-L. Pierre, *Bull. Soc. Fr.* **1994**, *131*, 620-631.
- [11] E. Culotta, D. E. Koshland Jr., *Science*, **1992**, *258*, 1862-1865.

### 8.2 Spezielle Literatur

- [12] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2446-2453.
- [13] N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura, T. Nagano, *FEBS Letters* **1998**, *427*, 263-266.
- [14] T. Rieth, K. Sasamoto, *Anal. Comm.* **1998**, *35*, 195-197.
- [15] S. Lecour, V. Maupoil, O. Siri, A. Tabard, L. Rochette, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *Vol. 33, No. 1*, 78-85.
- [16] N. Villeneuve, F. Bedioui, K. Voituriez, S. Avaro, J. P. Vilaine, *JPM* **1998**, *Vol. 40, No. 2*, 95-100.
- [17] R. Stringele, D.A. Wilson, R. J. Traystman, D. F. Hanley, *J. Am. Physiol. Soc.* **1998**, H1698-H1704.

- [18] M. Tristani-Firouzi, E. G. DeMaster, B. J. Quast, D. P. Nelson, S. L. Archer, *J. Lab. Clin. Med.* **1998**, 281-285.
- [19] V. Brokovych, E. Stolarczyk, J. Oman, T. Tombouliau, T. Malinski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, 135-143.
- [20] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H.-G. Korth, R. Sustmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, No. 6, 1738-1747.
- [21] K. J. Franz, N. Singh, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2194-2197.
- [22] M. Feelisch, J. S. Stamler *Methods in Nitric Oxide Research*, Kapitel 7, Wiley Chichester, **1996**, 71-115.
- [23] H. Knodel, U. Kull, *Ökologie und Umweltschutz*, 2. Auflage J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung Stuttgart, **1983**, 164.
- [24] A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter-Verlag Berlin, New York, **1985**, 580-582.
- [25] W. Murrell, *Lancet* **1876**, 1, 80-81; 113-115; 151-152; 225-227.
- [26] S. R. Hanson, T. C. Hutsell, L. K. Keefer, D. L. Mooradian, D. J. Smith, *Adv. Pharmacol.* **1995**, 34, 383.
- [27] D. L. Mooradian, T. C. Hutsell, L. K. Keefer, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, 25, 674.
- [28] A. P. Dicks, H. R. Swift, D. L. H. Williams, A. R. Butler, H. H. Al-Sa'doni, B. G. Cox, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1996**, 481-487.
- [29] A. J. Holmes, D. L. H. Williams, *Chem. Commun.* **1998**, 16, 1711-1712.
- [30] T. W. Hart, *Tetrahedron Letters*, **1985**, Vol. 26, 16, 2013-2016.
- [31] L. Field, R. V. Dilts, R. Ravichandran, *J. Chem. Soc. Commun.* **1978**, 1157, 249-252.
- [32] K. Wang, W. Zhang, M. Xian, Y.-C. Hou, X.-C. Chen, J.-P. Cheng, P. G. Wang, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 821-834.
- [33] B. Gaston, J. M. Drazen, J. Loscalzo, J. S. Stamler, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, 149, 538-542.
- [34] S. A. Lipton, *Nature*, **2001**, 413, 118-121.
- [35] D. J. Stuehr, N. S. Kwon, C. F. Nathan, O. W. Griffith, P. L. Feldmann, J. Wisemann, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6259-6263.
- [36] H. M. Abu-Soud, D. J. Stuehr, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 10769-10772.

- [37] M. Hecker, T. R. Billar, *Methodes in Nitric Oxide Research*, Kapitel 18, Wiley, Chichester, **1996**, 259-270.
- [38] R. Kilbourn, T. R. Billar, *Methods in Nitric Oxide Research*, Kapitel 43, Wiley, Chichester, **1996**, 619-630.
- [39] W. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch mit Syndromen und Nomina Anatomica*, 255. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1986**, 76-77.
- [40] K. Jones, *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Kap. 19, Bd. 2, Pergamon Press Oxford, **1973**, 323-325.
- [41] F. T. Bonner, G. Stedman, *Methodes in Nitric Oxide Research*, Kap. 1, Wiley Chichester, **1996**, 3-18.
- [42] T. P. Melia, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1965**, 27, 95-98.
- [43] R. S. Lewis, W. M. Deen, *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 568-574
- [44] H. H. Award, D. M. Stanbury, *Int. J. Chem. Kin.* 1993, 25, 1289.
- [45] M. Kirsch, H. de Groot, *J. Bio. Chem.* **2002**, 277, 13379-13388.
- [46] E. S. Chen, W. E. Wentworth, E. C. M. Chen, *J. Mol. Strukt.* **2002**, 606, 1-7.
- [47] M. D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K. M. Miranda, C. Switzer, J. M. Fukuto, P. J. Farmer, D. A. Wink, K. N. Houk, *PNAS*, **2002**, 99, 17, 10958-10963.
- [48] G. Jander, E. Blasius, *Einführung in das anorganisch-chemische Grundpraktikum*, 13. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, **1990**, 105.
- [49] Y. A. Henry, D. J. Singel, *Methodes in Nitric Oxide Research*, Kap. 24, Wiley Chichester, **1996**, 357-372.
- [50] L. Green, *Analyt. Biochem.* **1982**, 203, 131-138.
- [51] T. P. Misko, R. J. Schilling, D. Salvemini, W. M. Moore, M. G. Currie, *Analyt. Biochem.* **1993**, 214, 11-16.
- [52] M. Marzinzig, A. K. Nüssler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N. C. Nüssler, H. G. Beger, S. M. Morris, Jr., U. B. Brückner, *Nitric Oxide: Biologie and Chemistry* **1997**, 1, 177-189.
- [53] H. Kojima, T. Nagano, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 763-765.
- [54] Y. Katayama, S. Takahashi, M. Maeda, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 365, 159-167.
- [55] T. Nagano, T. Yoshimura, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1235-1270.
- [56] N. Soh, Y. Katayama, M. Maeda, *Analyst*, **2001**, 126 (5), 564-566.
- [57] H.-G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 891-893.

- [58] H.-G. Korth, R. Sustmann, P. Lommes, T. Paul, A. Ernst, H. de Groot, L. Hughes, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2767-2777.
- [59] M. Bätz, H.-G. Korth, R. Sustmann, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1501-1503.
- [60] M. Bätz, H.-G. Korth, P. Meineke, R. Sustmann, *Methods in Enzymology* Kap. 54, **1999**, *301*, 532-539.
- [61] A. Huisman, V. Stenert, R. Sustmann, H.-G. Korth, P. Boer, H. de Groot, E. E. van Faassen, Manuskript in Vorbereitung.
- [62] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H.-G. Korth, R. Sustmann, *J. Biol. Chem.* **2000**, *381* (7), 575-582.
- [63] P. Meineke, *Dissertation* Universität Essen, **1999**.
- [64] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1991**, 16.
- [65] A. Werner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1904**, *36*, 3083-3088.
- [66] K. Brass, E. Ferber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1922**, *55*, 541-556.
- [67] A. G. Guiumanini, G. Chiavari, M. M. Musiani, P. Rossi, *Synthesis*, **1980**, 743-746.
- [68] W. Dilthey, *J. Prakt. Chem. N.F.* **1935**, *143*, 189-210.
- [69] I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra Of Aromatic Molecules*, 2. Edition, Academic Press, London and New York, **1971**, 376.
- [70] I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra Of Aromatic Molecules*, 2. Edition, Academic Press, London and New York, **1971**, 381-385.
- [71] M. Bätz, *Dissertation* Universität Essen, **1997**.
- [72] D. W. Jones, A. Pomfred, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1991**, 13-18.
- [73] H. D. Scharf, W. Pinske, M.-H. Feilen, W. Droste, *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 554-563.
- [74] C. F. H. Allen, J. A. VanAllen, *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 845-854.
- [75] E. A. Harrison, H. L. Ammon, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 6, 943-947.
- [76] L. Horner, K.-H. Weber, *Chem. Ber.* **1964**, *98*, 1246-1251.
- [77] J. Schmidt, J. Söll, *Chem. Ber.* **1908**, *41*, 3679-3695.
- [78] K. Brass, G. Nickel, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1925**, *441*, 217-227.
- [79] G. G. Stokes, *Philos. Trans. Roy. Soc. London* **1852**, *142*, 463.
- [80] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, second Edition, Marcel Dekker Inc. New York, **1990**, 23-33.

- [81] G. Schwedt, *Fluorimetrische Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim **1981**, 3-6.
- [82] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Weinheim, **1994**, 56-58.
- [83] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Weinheim, **1994**, 192.
- [84] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, second Edition, Marcel Dekker Inc. New York, **1990**, 43-45.
- [85] F. W. Küster, A. Thiel, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, 104. Auflage, Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York, **1993**, 238-239.
- [86] A. L. Lehninger, *Biochemie*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, **1987**, 353.
- [87] H. O. Jauregui, N. T. Hayner, J. L. Driscoll, R. Williams-Holland, M. H. Lipsky, P. M. Galletti, *In Vitro*, **1981**, 17, 1100-1110.
- [88] A. Ramamurthi, R. S. Lewis, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10 (4), 408-413.
- [89] L. K. Keefer, R. W. Nims, K. M. Davis, D. A. Wink, *Methods in Enzymology*, Kap. 27, **1996**, 268 A, 281-293.
- [90] M. Kirsch, H. de Groot, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16, 13379-13388.
- [91] M. Kirsch, H.-G. Korth, V. Stenert, R. Sustmann, H. de Groot, Manuskript in Vorbereitung
- [92] E. R. Werner, G. Werner-Felmayer, H. Wachter, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **1993**, 203, 1-12.
- [93] M. A. Tahey, M. A. Marletta, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 19654-19658.
- [94] N. S. Kwon, C. F. Nathan, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20496-20451.
- [95] J. Vasques-Vivar, J. Whitsett, P. Martasek, N. Hogg, B. Kalyanaraman, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31, 975-985.
- [96] A. B. Ross, W. G. Mallard, W. P. Helman, G. V. Buxton, R. E. Huie, P. Neta, *NDRL/NIST Solution Kinetics Database 3.0*, **1998**, NDRL/NIST, Gaithersburg, MD.
- [97] K. B. Patel, M. R. L. Stratford, P. Wardman, S. A. Everett, *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 203-211.
- [98] M. Kirsch, H. de Groot, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (16), 13379-13388.
- [99] W. Friederich, *Handbuch der Vitamine*, Kap. 13, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, **1987**, 597, 618-630.
- [100] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, **1990**, 10.



- [101] W. Friederich, *Handbuch der Vitamine*, Kap. 13, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, **1987**, 597, 610-613.
- [102] M. E. Murphy, *Brit. J. Pharmacol.* **1999**, 128, 435-443.
- [103] C. M. Paleos, P. Dais, *J. C. S. Chem. Comm.* **1977**, 121, 345-346.
- [104] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 19. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart, **1981**.
- [105] J. N. Amor, *J. Chem. Eng. Data*, **1974**, 19 (1), 82-84.
- [106] A. F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1985**, 583-584.
- [107] R. S. Lewis, W. M. Deen, *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 568-574
- [108] N. V. Gorbunov, A. N. Osipov, M. A. Sweetland, B. W. Day, N. M. Elisayed, V.E. Kagan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 219, 835-841.
- [109] M. Kirsch, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [110] z.B.: S. Rindone, *J. Chem. Soc. B*, **1971**, 2238.
- [111] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Weinheim, **1990**, Kap. 28, 703-729.
- [112] H.-G. Korth, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [113] J. M. Fukuto, A. J. Hobbs, L. J. Ignarro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 196, 707-713.
- [114] M. Kirsch, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [115] W. A. Seddon, M. J. Young, *Can. J. Chem.* **1969**, 48, 393-394.
- [116] W. A. Seddon, J. W. Fletcher, F. C. Sopchyshyn, *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 1123-1130.
- [117] Kaufmann, Meyer zu Reckendorf, *J. Chem. Soc.* **1955**, 1706-1708.
- [118] Kaufmann, Meyer zu Reckendorf, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 2810.
- [119] D. R. Carcanague, C. B. Knobler, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4, 1515-1517.
- [120] Patent der Bayer AG, DE1129163, **1962**.
- [121] D. L. Brydon et.al. *J. Chem. Soc. B*, **1971**, 1996-2006.
- [122] Manchot, Krische, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1904**, 337, 200.
- [123] Manchot, Zahn, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1906**, 345, 332.
- [124] R. P. L'Esperance, D. Van Engen, R. Payeev, R. A. Pascal, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2, 688-694.

- [125] S. Inaba, R.D. Rieke, *Chem. Lett.* **1984**, 25-28.
- [126] S. Inaba, R.D. Rieke, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 9, 1373-1381.
- [127] S. Herzog, *Z. Chem.* **1964**, 4, 1-11.
- [128] Heinz G. O. Becker *et. al.* *Organikum*, **1976**, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, DDR, 647.
- [129] M. Neuenschwander, R. Iseli, *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 1061-1072.
- [130] H. Koch, *Monatsh.* **1962**, 93, 1343-1347.
- [131] H. Koch, L. Katlan, K. Markut, *Monatsh.* **1965**, 96, 16646-1657.
- [132] *Instruction Manual ISO-NO* von WPI, Kap. 2, 1-5.
- [133] *Skript zum Praktikum der Physiologischen Chemie*, Universitätsklinikum Essen, **2000**, 3.4-3.11.